

LEVENSDUURVERLENGING IN *CAENORHABDITIS ELEGANS*: METHODEN, METABOLE ASPECTEN EN STRESSRESISTENTIE

ISABELLE LENAERTS

PROMOTOR:

PROF. DR. JACQUES VANFLETEREN

LEDEN VAN DE LEESCOMMISSIE:

PROF. DR. ROLF HOEKSTRA (Universiteit Wageningen)

DR. GERT DE WILDE (Devgen)

PROF. DR. JACQUES VANFLETEREN (Universiteit Gent)

LEDEN VAN DE EXAMENCOMMISSIE:

PROF. DR. LUC MOENS (Universiteit Antwerpen)

PROF. DR. BART BRAECKMAN (Universiteit Gent)

PROF. DR. GAETAN BORGONIE (Universiteit Gent)

DR. FREDERIK HENDRICKX (Universiteit Gent)

PROF. DR. TOM MOENS (Universiteit Gent)

PROF. DR. WIM VIJVERMAN (Universiteit Gent)

PUBLIEKE VERDEDIGING:

VRIJDAG 26 OKTOBER 2007, OM 15H

UNIVERSITEIT GENT

AUDITORIUM 4, K.L. LEDEGANCKSTRAAT 35, 9000 GENT

Dankwoord

Oef, ik ben er geraakt! Het ging met vallen en opstaan, maar onderweg heb ik heel veel bijgeleerd en dat maakt van dit doctoraat een onvergetelijke ervaring! Verschillende mensen stonden steeds voor me klaar met hulp en goede raad, een luisterend oor, praktische adviezen, enz. Dit werk was niet mogelijk geweest zonder hen en ik wil ze dan ook hartelijk danken!

Eerst en vooral wil ik Jacques bedanken omdat hij me de kans gaf dit doctoraat tot een goed einde te brengen.

Mijn collega's zou ik willen bedanken voor de goede samenwerking en de fijne sfeer in het labo gedurende al die jaren. Enkele mensen verdienen hier een speciale vermelding. Sylvie en Kristel wil ik speciaal bedanken voor de morele steun die ik van hen kreeg! Zij hadden steeds een luisterend oor en goede raad als het wat moeilijker ging. Sylvie wil ik ook extra bedanken voor al de praktische hulp. Ook al was het werk naar het einde toe nogal repetitief, ze werkte steeds met veel inzet en enthousiasme verder. We vormden een goed team! Bart, Filip en Andy wil ik in het bijzonder bedanken omdat ze me leerden werken met allerlei computerprogramma's en omdat ze steeds voor me klaarstonden bij grote en kleine computerproblemen. Tenslotte wil ik ook Annemie bedanken omdat ze op onvermoeibare wijze oplossingen en antwoorden weet te bedenken voor de dagelijkse praktische problemen en probleempjes in het labo.

Ik kon ook rekenen op hulp buiten het labo. Luc Van Hoorebeke en Pieter Vanderniepen wil ik bedanken voor het uitvoeren van de talloze bestralingen. Frederik hielp me bij mijn 'statistiek-problemen' en daarvoor wil ik hem oprecht bedanken.

Een beetje ontspanning is af en toe ook nodig. Renata was steeds te vinden voor een frisse duik, een film of een babbel. Ik wil haar heel erg bedanken omdat ze altijd voor me klaarstond!

Ik wil ook mijn ouders oprecht bedanken voor alle steun die ik van hen gekregen heb. Zij zijn steeds in mij blijven geloven en hebben me aangemoedigd om de kansen die ik kreeg met beide handen te grijpen.

Bruno wil ik bijzonder danken voor zijn onophoudelijk optimisme en om altijd in mij en de goede afloop te blijven geloven. De grote hoeveelheden werk die in het labo nog op mij lagen te wachten maakten dat ik dikwijls in de weekends van huis was. Vooral het afgelopen jaar was er voor hem en Lies niet veel tijd over. Daar zal nu eindelijk verandering in komen! Vanaf nu word ik weer in de eerste plaats mama en keukenprinses! En ik zal zen zijn!

Gent, 26 oktober 2007

Inhoudstafel

Voorwoord.....	1
1 Doelstellingen.....	2
2 Inleiding tot veroudering en calorische restrictie	3
2.1 Definitie van veroudering	3
2.2 Studie van veroudering	4
2.3 Calorische restrictie.....	7
3 Verouderingstheorieën.....	9
3.1 Inleiding	9
3.2 Mechanistische theorieën	9
3.2.1 Vrije-radicaaltheorie	9
3.2.1.1 Ontwikkeling van de theorie	9
3.2.1.2 Reactieve zuurstofradicalen.....	10
3.2.1.2.1 Het hydroxylradicaal.....	10
3.2.1.2.2 Het superoxide anion.....	11
3.2.1.2.3 Waterstofperoxide.....	11
3.2.1.3 Voornaamste plaatsen van ROS productie	12
3.2.1.4 Oxidatieve schade aan macromoleculen.....	14
3.2.1.5 Verdedigingsmechanismen tegen oxidantia	15
3.2.1.5.1 Enzymatische antioxidantia	15
3.2.1.5.2 Niet-enzymatische antioxidantia	17
3.2.1.5.3 Regulatie van metaalionen.....	18
3.2.1.6 Herstel van oxidatieve schade	19
3.2.1.7 ROS als signalisatiemoleculen	19
3.2.1.8 Evaluatie van de vrije-radicaaltheorie	20
3.2.2 Telomeerverkorting	21
3.3 Evolutive theorieën	23
4 Veroudering en calorische restrictie in de nematode <i>C. elegans</i>.....	25
4.1 De biologie van <i>C. elegans</i>	25
4.1.1 Inleiding.....	25
4.1.2 Morfologie	25
4.1.3 Levenscyclus.....	27
4.1.4 Genetica.....	28

4.2 Kenmerken van veroudering in <i>C. elegans</i>	29
4.3 Regulatie van de levensduur in <i>C. elegans</i>	31
4.3.1 Endocriene signalisatie	31
4.3.1.1 Dauers.....	31
4.3.1.2 Insuline signalisatie	32
4.3.1.3 Timing van insuline signalisatie	35
4.3.1.4 Weefsel-specifieke insuline signalisatie	36
4.3.1.5 Andere <i>pathways</i> die DAF-16 reguleren	38
4.3.1.5.1 Sensorische perceptie	38
4.3.1.5.2 Germline signalisatie.....	38
4.3.1.5.3 JNK signalisatie	39
4.3.1.5.4 Regulatie door <i>tubby</i>	39
4.3.1.5.5 Regulatie door SIR2	40
4.3.1.6 Coregulatoren van DAF-16	41
4.3.1.7 <i>Downstream</i> genen van DAF-16	42
4.3.1.8 Metabolisme van insuline <i>pathway</i> mutanten	44
4.3.2 Mitochondriale regulatie	45
4.3.2.1 Langlevende Mit mutanten.....	46
4.3.2.2 Kortlevende Mit mutanten.....	48
4.3.2.3 De drempelwaarde-effect hypothese	49
4.3.3 AAK-2.....	49
4.3.4 mRNA translatie	50
4.3.5 Calorische restrictie	52
4.3.5.1 Opname van voedsel.....	52
4.3.5.1.1 De farynx.....	52
4.3.5.1.2 De darm.....	53
4.3.5.1.2.1 Natrium-gekoppelde transporters.....	53
4.3.5.1.2.2 De <i>pep-2</i> en <i>nhx-2</i> transporters	54
4.3.5.2 Methoden voor calorische restrictie in <i>C. elegans</i>	55
4.3.5.2.1 Verdunning van de voedselbron.....	56
4.3.5.2.2 <i>eat</i> mutanten	56
4.3.5.2.2.1 <i>eat-1</i>	57
4.3.5.2.2.2 <i>eat-2</i>	57
4.3.5.2.2.3 <i>eat-6</i>	58
4.3.5.2.3 Groei in axenisch medium	58
4.3.5.3 Mechanismen van levensduurverlenging door CR.....	59
4.3.5.3.1 Gereduceerde metabole snelheid.....	60
4.3.5.3.2 Verminderde INS/IGF-1 signalisatie	62
4.3.5.3.3 CR-specifieke transcriptiefactoren	63
4.3.5.3.4 Activering van sirtuïnes	64
4.3.5.3.5 Verminderde TOR signalisatie.....	65
4.3.5.3.6 AAK-2 activering.....	68

5 Veroudering is evolutief geconserveerd	69
5.1 Overzicht van veel gebruikte modelorganismen.....	69
5.1.1 Gist.....	69
5.1.2 Schimmel	71
5.1.3 Fruitvliegen	72
5.1.4 Knaagdieren, apen en de mens	74
5.1.4.1 Studies in celculturen	74
5.1.4.2 Kenmerken van veroudering in zoogdieren.....	75
5.1.4.3 CR in knaagdieren	76
5.1.4.4 CR in apen en de mens	77
5.2 Overzicht van enkele geconserveerde <i>pathways</i>	79
5.2.1 Insuline/IGF-1 signalisatie	79
5.2.1.1 <i>S. cerevisiae</i>	79
5.2.1.2 <i>C. elegans</i>	80
5.2.1.3 <i>D. melanogaster</i>	81
5.2.1.4 Zoogdieren.....	83
5.2.2 Sirtuïnes als regulatoren van de levensduur	85
5.2.2.1 Positieve regulatie van de levensduur	85
5.2.2.1.1 <i>S. cerevisiae</i>	85
5.2.2.1.2 <i>C. elegans</i> en <i>D. melanogaster</i>	86
5.2.2.1.3 Zoogdieren	87
5.2.2.2 Negatieve regulatie van de levensduur.....	88
5.2.3 TOR signalisatie	90
5.2.3.1 Overzicht van de <i>pathway</i>	90
5.2.3.2 Regulatie van de levensduur.....	93
5.2.3.2.1 <i>S. cerevisiae</i> en <i>P. anserina</i>	93
5.2.3.2.2 <i>C. elegans</i>	93
5.2.3.2.3 <i>D. melanogaster</i>	93
5.2.4 Mitochondriale regulatie van de levensduur	94
5.2.4.1 <i>S. cerevisiae</i>	94
5.2.4.2 <i>P. anserina</i>	95
5.2.4.3 <i>C. elegans</i>	96
5.2.4.4 <i>D. melanogaster</i>	97
5.2.4.5 Zoogdieren.....	98
5.3 Besluit.....	99
6 Materiaal en methoden.....	100
6.1 Gebruikte stammen en media	100
6.2 Invriezen van nematoden	101
6.3 Synchrone wormpopulaties bekomen.....	102

6.4 Procedures voor <i>C. elegans</i>	102
6.4.1 Biologische variabelen	102
6.4.1.1 Bepaling van de levensduur	102
6.4.1.2 Bepaling van de fertiliteit	103
6.4.1.3 Bepaling van wormvolumes	103
6.4.2 Fysiologische en enzymatische testen	104
6.4.2.1 Bereiding van wormhomogenaten	104
6.4.2.2 Meting van de autofluorescentie	104
6.4.2.3 Bepaling van de ATP-concentratie	105
6.4.2.4 Bepaling van de lichtproductiepotentiaal	106
6.4.2.5 Bepaling van de aconitase activiteit	107
6.4.2.6 Bepaling van de catalase activiteit	107
6.4.2.7 Meten van het eiwitgehalte	107
6.5 Procedures voor <i>E. coli</i>	108
6.5.1 Inhibitie van bacteriële groei	108
6.5.1.1 Bestraling	108
6.5.1.2 Carbenicilline behandeling	109
6.5.2 Bepaling van viabiliteit en metabole activiteit	109
6.5.2.1 Viabiliteitskleuring	109
6.5.2.2 Bepaling van het zuurstofverbruik	110
6.5.2.3 Bepaling van de warmteproductie	110
6.6 Statistische methoden	111
6.6.1 Analyse van overlevingsdata	111
6.6.2 Analyse van de wormvolumes	112
6.6.3 Analyse van het aantal nakomelingen	112
6.6.4 Analyse van metabole parameters en enzymatische testen	113
 7 Resultaten en discussie	 114
7.1 Optimalisatie van nieuwe methoden voor CR in <i>C. elegans</i>	114
7.1.1 Inleiding	114
7.1.2 Materiaal en methoden	115
7.1.3 Resultaten	116
7.1.3.1 Nieuwe methoden voor CR op vaste voedingsbodems	116
7.1.3.1.1 Verdunning van <i>E. coli</i> in afwezigheid van extra nutriënten	116
7.1.3.1.2 Verdunning van <i>E. coli</i> op axenische platen	120
7.1.3.2 Mechanismen van levensduurverlenging in axenische cultuur	124
7.1.3.2.1 De concentratie aan nutriënten in axenisch medium is niet bepalend voor het CR effect	124
7.1.3.2.2 De <i>E. coli</i> component die de effecten van axenische cultuur onderdrukt is hittegevoelig en niet diffundeerbaar	127

7.1.3.2.3 Verse organische extracten onderdrukken gedeeltelijk de effecten van axenische cultuur op ontwikkeling, fertiliteit en levensduur	128
7.1.3.2.4 De onderdrukking van de axenisch medium effecten is gecorreleerd met de aanwezigheid van levende, metabool actieve <i>E. coli</i>	131
7.1.3.2.4.1 Karakterisering van bestraalde bacteriën	131
7.1.3.2.4.2 Effect van bacteriële stralingsdosis op levensduur en fertiliteit van <i>C. elegans</i>	132
7.1.4 Discussie	135
7.1.4.1 Evaluatie van de nieuwe plaatmethoden voor CR.....	135
7.1.4.1.1 CR en levensduur	135
7.1.4.1.2 CR en fertiliteit.....	138
7.1.4.1.3 CR en lichaamsgrootte	139
7.1.4.2 Groei van <i>C. elegans</i> in axenische cultuur reflecteert een noodzaak voor nutriënten aanwezig in metabool actieve <i>E. coli</i>	139
7.1.5 Besluit	142
7.2 Evaluatie van eat mutanten als model voor calorische restrictie in <i>C. elegans</i>.	142
7.2.1 Inleiding.....	142
7.2.2 Materiaal en methoden.....	143
7.2.3 Resultaten en discussie	144
7.2.3.1 Agarplaten zonder nutriënten met <i>E. coli</i> stam K12	144
7.2.3.2 NGM platen met OP50.....	146
7.2.3.3 NGM platen met <i>E. coli</i> stam OP50 en carbenicilline.....	147
7.2.4 Besluit	150
7.3 Vertraagde veroudering in calorisch gerestricteerde wormen.....	151
7.3.1 Inleiding.....	151
7.3.2 Materiaal en methoden.....	151
7.3.3 Resultaten.....	152
7.3.4 Discussie.....	154
7.4 Levensduurverlenging in totale afwezigheid van voedsel	156
7.4.1 Inleiding.....	156
7.4.2 Materiaal en methoden.....	156
7.4.3 Resultaten.....	157
7.4.4 Discussie.....	158
7.5 Onderzoek naar verouderings-geassocieerde metabole en fysiologische veranderingen in jonge <i>C. elegans</i> culturen.....	159
7.5.1 Inleiding.....	159
7.5.2 Materiaal en methoden.....	160
7.5.3 Resultaten.....	161
7.5.4 Discussie.....	163
7.6 Bepaling van de SOD activiteit in <i>C. elegans</i>. optimalisatie van een methode gebaseerd op chemiluminescentie en onderzoek naar stressresistentie in langlevende wormen.....	165
7.6.1 Optimalisatie van de SOD <i>assay</i>	165

7.6.1.1 Inleiding.....	165
7.6.1.2 Materiaal en methoden	166
7.6.1.2.1 Rationale van de assay	166
7.6.1.2.2 Reagentia.....	167
7.6.1.2.3 Chemiluminescentie assay	167
7.6.1.2.4 Berekening van de SOD activiteit.....	168
7.6.1.3 Resultaten en discussie	169
7.6.1.4 Besluit.....	172
7.6.2 Antioxidatieve enzymactiviteiten in langlevende wormen	173
7.6.2.1 Inleiding.....	173
7.6.2.2 Materiaal en Methoden.....	174
7.6.2.3 Resultaten	175
7.6.2.3.1 Dauers	175
7.6.2.3.2 Insuline/IGF-1 mutanten	176
7.6.2.3.3 <i>Clk</i> mutanten	177
7.6.2.3.4 Calorisch gerestricteerde wormen.....	178
7.6.2.4 Discussie.....	180
8 Samenvatting.....	182
9 Synopsis en toekomstplannen	186
10 Bijlagen.....	189
10.1 Overzicht van wiskundige modellen voor de studie van verouderende populaties.....	189
10.2 Lijst van publicaties.....	191
11 Referenties.....	192

Voorwoord

Het begrijpen van de aard van de processen die veroudering en levensduur bepalen is één van de meest intrigerende, maar ook moeilijkste vraagstukken uit de biologie. Verhalen zoals de 'Fontein van de jeugd', waarin een legendarische bron verjonging schenkt aan ieder die van zijn water drinkt, illustreren de fascinatie van de mensheid voor de eeuwige jeugd. Met de aanvang van de 21^{ste} eeuw is deze belangstelling stilaan een obsessie geworden. Getuige daarvan de zes miljard dollar die in de Verenigde Staten jaarlijks gespendeerd worden aan zogenaamde 'anti-verouderingsmedicijnen' (Wick, 2002). Een zoektochtje op het internet levert dan ook een hele lijst op van voedselsupplementen, crèmes, kuren en diëten die aangeprijsd worden voor hun verjongende eigenschappen.

Ondanks het feit dat de maximale levensduur van de mens de voorbije 100 jaar redelijk constant bleef (ongeveer 120 jaar), steeg de gemiddelde levensverwachting bij de geboorte spectaculair. Zo werd in het Westen een stijging vastgesteld van 45 jaar in de jaren 1900 tot 75 jaar voor mannen en 80 jaar voor vrouwen vandaag. Deze stijging is in de eerste plaats toe te schrijven aan de verbeterde afvalverwerking en hygiënische omstandigheden, een verminderde kindersterfte, de ontwikkeling van antibiotica en vaccins, en de verbeterde gezondheidszorg. Niets lijkt er echter op te wijzen dat deze trend zal wijzigen. Het *Population Division of the United Nations Department of Economic and Social Affairs* (www.un.org/esa/population/publications/) schat dat tegen 2050 meer dan 370 miljoen mensen ouder zullen zijn dan 80 jaar. Dat is een zesvoud van de 66 miljoen in 1998. Ook is er wereldwijd een maandelijkse netto toename met 800 000 personen ouder dan 65 jaar. Deze dramatische demografische verschuiving vormt een grote uitdaging voor de gezondheidszorg, aangezien ze ook een impact heeft op het voorkomen van ouderdomsgerelateerde ziekten (en de kosten die daaraan verbonden zijn). Bijgevolg is de onderzoekswereld steeds meer gericht op het ontdekken van interventies die succesvol verouderen bevorderen (Hayflick, 2000; Nikolich-Zugich en Messaoudi, 2005; Fontana en Klein, 2007). Omdat calorische restrictie, de verminderde opname van voedsel zonder ondervoeding, het verouderingsproces kan vertragen in een brede waaier aan organismen, krijgt dit fenomeen steeds meer aandacht als een mogelijke 'anti-verouderingsinterventie'.

De ontwikkeling van nieuwe molecuulair-biologische technieken en de ontdekking van mutaties en interventies die de levensduur van tal van laboratoriumorganismen sterk konden verlengen, heeft in de wetenschappelijke wereld geleid tot een stijgende interesse voor het verouderingsproces, met een exponentiële toename in de kennis van dit onderwerp tot gevolg. Zo leverde een zoektocht in de Pubmed databank (met de zoekterm *aging*) een lijst van bijna 10 000 artikels op. De zoekterm *dietary restriction* leverde nog eens meer dan 6000 artikels op. Het onderzoek naar veroudering draait dus op volle toeren, of, om het met de woorden van Gordon Lithgow (2006) te zeggen, verouderingsonderzoek is *cool*.

1 Doelstellingen

Om het verouderingsproces in complexe organismen, zoals de mens, te begrijpen, kan het nuttig zijn om dit proces eerst te bestuderen in eenvoudigere systemen. Fundamenteel onderzoek naar veroudering gebeurt voornamelijk in de gist *Saccharomyces cerevisiae*, de rondworm *Caenorhabditis elegans*, de fruitvlieg *Drosophila melanogaster*, muizen en ratten, en soms ook apen. De ontdekking van gemeenschappelijke determinanten van veroudering in deze evolutief divergente organismen, laat vermoeden dat de studie van veroudering in deze modelsystemen aanzienlijk kan bijdragen tot de kennis van het menselijke verouderingsproces. In dit werk werd gebruik gemaakt van de nematode *C. elegans* als modelorganisme voor de studie van veroudering en calorische restrictie. In tegenstelling tot het onderzoek naar de effecten van calorische restrictie in bv. *D. melanogaster* of knaagdieren, bleef de studie van deze interventie in *C. elegans* een beetje achterop hinken bij gebrek aan robuuste en betrouwbare methoden. Dit doctoraat heeft zich dan ook voornamelijk toegespitst op de ontwikkeling van nieuwe benaderingen om *C. elegans* te onderwerpen aan calorische restrictie. Ook werd een reeds gevestigde methode (het gebruik van *eat* mutanten met defecten in de voedselopname) uitgebreid onder de loupe genomen. Vervolgens werd nagegaan of calorische restrictie in *C. elegans* een echte vertraging van het verouderingsproces veroorzaakt. Er werd ook bestudeerd waarom de respons van wormen op de afwezigheid van de bacteriële voedselbron verschillend is op agarplaten en in vloeibare cultuur. In een volgend hoofdstuk werd onderzocht of er in een populatie die nog niet met sterfte af te rekenen heeft reeds metabole (en andere) veranderingen zijn die wijzen op veroudering. Tenslotte werd ook een verbeterde methode voor de bepaling van de superoxidedismutase (SOD) activiteit op punt gesteld. Dit enzym met antioxidatieve eigenschappen krijgt veel aandacht in het verouderingsonderzoek, omdat oxidatieve stress nog steeds beschouwd wordt als een belangrijke oorzaak van veroudering. De activiteit van dit enzym werd dan ook bestudeerd in een verscheidenheid aan langlevende wormen.

Dit doctoraat is opgebouwd uit verschillende hoofdstukken. De Hoofdstukken 2, 3, 4 en 5 omvatten de literatuurstudie. In Hoofdstuk 2 wordt uitgelegd wat veroudering is en hoe die kan bestudeerd worden. Ook wordt beschreven wat men verstaat onder calorische restrictie, en wordt toegelicht in welke opzichten deze interventie belangrijk is voor het onderzoek naar veroudering. Hoofdstuk 3 overloopt een aantal populaire verouderingstheorieën. In Hoofdstuk 4 wordt getracht een overzicht te geven van de stand van zaken in het onderzoek naar veroudering en calorische restrictie in de nematode *C. elegans*. Een overzicht van een aantal andere, veel gebruikte modelorganismen wordt gegeven in Hoofdstuk 5. In dit hoofdstuk wordt ook aangetoond dat het verouderingsproces grotendeels evolutief geconserveerd is. Het was geenszins de bedoeling om een volledig overzicht te geven van veroudering in het algemeen. Er werd echter zo veel mogelijk getracht om de nadruk te leggen op calorische restrictie, aangezien dit het voornaamste onderwerp is van dit proefschrift. Daarom werden hier bv. de planten niet besproken. Hoofdstuk 6 beschrijft de methoden die in dit doctoraat gebruikt werden. Tenslotte wordt in Hoofdstuk 7 uitgebreid ingegaan op de resultaten die uit dit werk voortkwamen.

2 Inleiding tot veroudering en calorische restrictie

2.1 Definitie van veroudering

Veroudering wordt gedefinieerd als een progressief, cumulatief en schadelijk proces dat zichtbaar wordt na de reproductieve periode, en dat resulteert in een toegenomen kwetsbaarheid met uiteindelijk de dood tot gevolg. Het is een stochastisch proces dat bepaald wordt door de interactie tussen genen, omgevingsfactoren en toeval (Gershon en Gershon, 2002; Jazwinski, 2002a). De vaststelling dat de levensduur van organismen varieert over een grootteorde van 1 000 000 tussen verschillende soorten van dieren en planten, impliceert dat dit proces onder aanzienlijke genetische controle staat. Er zijn echter ook behoorlijk wat verschillen in levensduur tussen en binnen populaties, wat suggereert dat het verouderingsproces ook gestuurd wordt door epigenetische en omgevingsfactoren (Finch, 1990; Gershon en Gershon, 2000). Zo worden bijenkoninginnen bv. 2 à 3 jaar oud, terwijl werksters (met een identiek genoom) slechts enkele weken tot maximaal 4 maanden overleven (Page en Peng, 2001). Veroudering is echter geen geprogrammeerd proces dat rechtstreeks gereguleerd wordt door genen. Studies in lagere organismen hebben wel geleid tot de identificatie van genen die betrokken zijn bij veroudering, maar hebben de ontwikkeling van het verouderingsproces niet volledig kunnen verhinderen of omkeren (Hayflick, 2000).

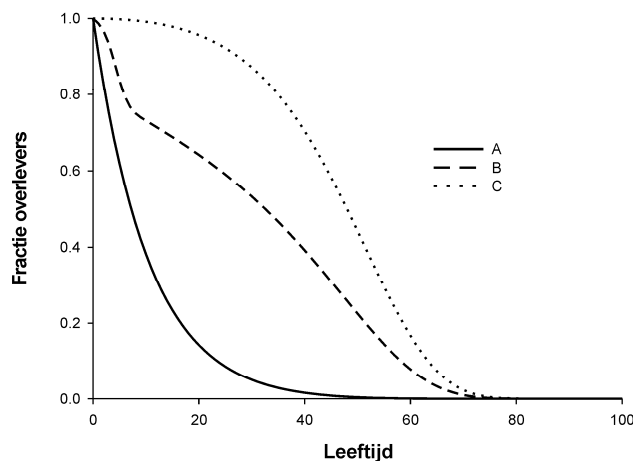
Veroudering gaat gepaard met heel wat veranderingen op morfologisch, moleculair en cellulair niveau (zie volgende hoofdstukken) en gaat in de mens ook samen met een verhoogde kans op het ontwikkelen van ouderdomsgerelateerde ziekten zoals hart- en vaatziekten en kanker. Verschillende criteria onderscheiden deze ziekten van echte ouderdomsverschijnselen. In tegenstelling tot ouderdomsgerelateerde ziekten, komen ouderdomsverschijnselen voor in elk volwassen organisme en in zo goed als alle soorten. Ouderdomsverschijnselen komen enkel voor na de reproductieve periode en verschijnen bovendien ook in wilde dieren die in gevangenschap leven, en bijgevolg beschermd worden door de mens, zelfs al leefden ze in de natuur nooit lang genoeg om veroudering te kunnen ondergaan (Hayflick, 1998).

Het feit dat populaties blijven voortbestaan terwijl individuen verouderen en sterven impliceert dat nakomelingen geproduceerd worden ten koste van hun ouders. Dit werd initieel verklaard door de scheiding tussen *germline* en soma. In tegenstelling tot de geslachtslijn, die onsterfelijk is en wordt doorgegeven aan opeenvolgende generaties, zal de soma onomkeerbare schade accumuleren en sterven na één enkele generatie (Kirkwood, 2002). Met de vaststelling dat veroudering ook voorkomt in unicellulaire organismen zonder scheiding tussen soma en *germline*, zoals de gist *Saccharomyces cerevisiae* (Lai *et al.*, 2002) en de bacterie *Caulobacter crescentus* (Ackermann *et al.*, 2003), werd een asymmetrische wijze van voortplanting naar voor geschoven als een minimale voorwaarde voor veroudering. Prokaryoten die zich voortplanten door symmetrische deling werden daarom beschouwd als niet verouderend en bijgevolg onsterfelijk. Een recente studie in *Escherichia*

coli toont echter aan dat veroudering wel degelijk voorkomt in symmetrisch delende cellen (Stewart *et al.*, 2005). Hoewel verondersteld werd dat de twee gevormde dochtercellen identiek waren, bleken ze toch functioneel asymmetrisch. Deze fysiologische asymmetrie zou een mechanisme van de cel kunnen zijn om zich te ontdoen van cellulaire schade. Naar analogie met de asymmetrische deling van *S. cerevisiae*, kan de cel met een 'oude' pool dus beschouwd worden als de verouderende ouder die herhaaldelijk jongere nakomelingen produceert.

2.2 Studie van veroudering

Verouderende populaties worden traditioneel geëvalueerd door overlevingscurven te construeren waaruit de gemiddelde en maximale levensduur afgeleid worden. In figuur 2.1 zijn enkele overlevingscurven weergegeven. Curve A stelt een populatie voor waarin externe factoren de voornaamste doodsoorzaken zijn. Dit is bv. het geval voor dieren in het wild die af te rekenen hebben met predatie. Curve C toont een populatie die geen externe doodsoorzaken kent en waarin de sterfte bijgevolg voornamelijk bepaald wordt door veroudering. Deze curve benadert de situatie in menselijke populaties in de ontwikkelde wereld en in dieren die in gevangenschap leven. Populaties waarin zowel externe factoren als veroudering bijdragen aan het sterftcijfer, zullen een overlevingscurve hebben die intermediair is tussen de curven A en C. Curve B stelt een menselijke populatie in de derde wereld voor. Deze populaties worden niet alleen gekenmerkt door een lagere levensverwachting, maar ook door een hogere kindersterfte.



Figuur 2.1: Overzicht van enkele overlevingscurven. A geeft een populatie weer waarin de sterfte vnl. bepaald wordt door externe factoren. B geeft een menselijke populatie uit de derde wereld weer (hoge kindersterfte). C geeft een populatie weer waarin de individuen vnl. sterven door veroudering.

De gemiddelde levensduur van een populatie is de leeftijd waarop 50% van deze populatie gestorven is. De maximale levensduur is letterlijk de leeftijd waarop het oudste organisme van een cohorte overleden is, maar wordt gewoonlijk berekend als de gemiddelde levensduur van de langstlevende 10% van een populatie. Hoewel de gemiddelde en maximale levensduur nuttig zijn bij de onderlinge vergelijking van populaties, geven ze geen uitsluitel over het feit of een verlengde levensduur het gevolg is van een echte vertraging van het verouderingsproces of van een latere aanzet van veroudering. Bovendien wordt de maximale levensduur ook beïnvloed door andere factoren dan veroudering (Finch,

1990; Masoro, 2006). Voorbeelden van zulke factoren zijn predatie in wilde populaties en ouderdomsgerelateerde ziekten. Ook werd vastgesteld dat de maximale levensduur afhankelijk is van de grootte van de onderzochte populatie (Masoro, 2006). Een betere benadering is daarom de studie van de toename in leeftijd-specifieke snelheid van sterven van een populatie.

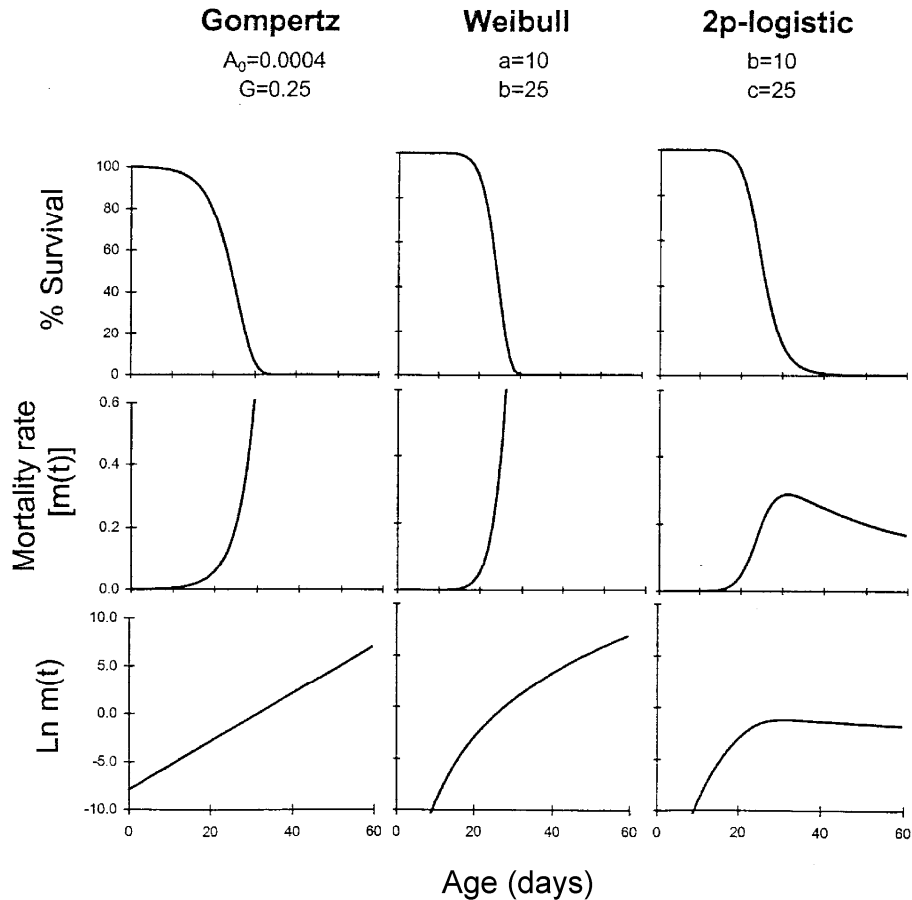
De exponentiële stijging van de leeftijd-specifieke sterfte of *mortality rate* met toenemende leeftijd is een typisch kenmerk van veroudering. Deze trend werd voor het eerst waargenomen in humane populaties door Benjamin Gompertz (1825), die het verband wiskundig uitdrukte met de vergelijking

$$m(t) = Ae^{Gt}$$

met $m(t)$ de *mortality rate* op tijdstip t , A de initiële *mortality rate* en G de Gompertz coëfficiënt die de versnelling van de *mortality rate* met de leeftijd uitdrukt. Als de *mortality rate* wordt uitgezet tegenover de leeftijd op een semi-logaritmische schaal, bekomt men een rechte met richtingscoëfficiënt G . De Gompertz coëfficiënt is dan ook een maat voor de snelheid van verouderen. De constante A (intercept) geeft de leeftijds-onafhankelijke mortaliteit weer en wordt ook aangeduid met de term 'intrinsieke kwetsbaarheid' (Finch, 1990). Hoewel het exponentiële verband tussen de *mortality rate* en de leeftijd ook werd vastgesteld bij andere soorten, tonen meer recente studies met grote experimentele populaties aan dat een kleine fractie van een cohorte vaak langer leeft dan voorspeld wordt door het model (Vaupel *et al.*, 1998). Dit werd ondermeer vastgesteld in een populatie van 1.2 miljoen vliegjes (*Ceratitis capitata*), waar de *mortality rate* afvlakte en uiteindelijk daalde op hoge leeftijd (Carey *et al.*, 1992). Ook uit een grootschalige studie in *C. elegans* bleek dat de leeftijd-specifieke *mortality rate* een bifasisch patroon vertoonde (Brooks *et al.*, 1994). Aangezien deze studie gebruik maakte van RI (*Recombinant Inbred*) stammen die een grote variabiliteit in levensduur vertonen, werd geconcludeerd dat de genetische heterogeniteit van de bestudeerde populatie aan de basis lag van de afwijking van de lineariteit op hoge leeftijd. Dit betekent dat indien fragielere individuen eerder zouden sterven, de populatie robuuster zou worden met toenemende leeftijd. De oudste individuen zouden dan bijgevolg een gereduceerde *mortality rate* hebben. Echter, ook genetisch identieke populaties blijken dit bifasische patroon te vertonen, zoals o.a. werd vastgesteld bij *D. melanogaster* (Curtsinger *et al.*, 1992) en *C. elegans* (Vanfleteren *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2001). Zeer recent werd in een isogene populatie van *C. elegans* aangetoond dat niet-genetische heterogeniteit aan de basis zou liggen van dit fenomeen (Rea *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). Met behulp van het GFP (*Green Fluorescent Protein*)-gen onder controle van de HSP-16 (*Heat Shock Protein*) promotor werd nagegaan of de mogelijkheid om zich te beschermen tegen stress verschilt tussen individuen van een zelfde populatie en of deze stressrespons gecorreleerd is met de levensduur. Expressie van het GFP-gen werd geïnduceerd door activering van de HSP-16 promotor na een milde *heat shock*. Er werd binnen één populatie een grote variatie in GFP-expressie vastgesteld. Bovendien bleken subpopulaties met een hoge GFP-fluorescentie (en dus grote capaciteit om te reageren op stress) een langere levensduur te hebben dan subpopulaties met een lage GFP-fluorescentie.

De Weibull-vergelijking en de twee-parametrische logistische functie (zie Bijlagen) zijn alternatieve modellen die het verband tussen *mortality rate* en leeftijd beschrijven. De drie

modellen verschillen van elkaar in de manier waarop de snelheid van sterven stijgt met toenemende leeftijd (Fig. 2.2). In het Gompertz model blijft de *mortality rate* exponentieel toenemen in functie van de leeftijd, terwijl deze in het Weibull model vertraagt op hogere leeftijd (Vanfleteren *et al.*, 1998; Ricklefs en Scheuerlein, 2002). In het twee-parametrische logistisch model tenslotte, zal de *mortality rate* eerst stijgen, maar op hogere leeftijd weer dalen (Vanfleteren *et al.*, 1998).



Figuur 2.2: Computersimulatie die de karakteristieken weergeeft van verschillende wiskundige modellen die het verband tussen *mortality rate* en de leeftijd beschrijven (Vanfleteren *et al.*, 1998).

Het onderzoek naar veroudering heeft zich toegespitst op verschillende domeinen. Zo werd veel aandacht geschonken aan de studie en preventie van ouderdomsgerelateerde ziekten. Hoewel dit resulteerde in een toename van de gemiddelde levensduur (en dus een verbeterde levenskwaliteit), heeft dit niet geleid tot een verlenging van de maximale levensduur. Een ander deel van het verouderingsonderzoek is erop gericht geweest om *biomarkers* van veroudering te vinden. Een *biomarker* van veroudering is een biologische parameter die, in afwezigheid van ziekte, aangeeft wat de functionele capaciteit van een organisme is en wat de te verwachten levensduur is. Deze *biomarker* moet kunnen getest worden zonder het organisme in kwestie te schaden en moet universeel zijn. De identificatie van zo'n *biomarker* zou van onschatbare waarde kunnen zijn voor de vooruitgang van het verouderingsonderzoek (als alternatief voor het gebruik van de

levensduur) en voor de identificatie van drugs die het verouderingsproces kunnen beïnvloeden (Johnson, 2006). Ondanks grote inspanningen werden echter tot op heden geen universele *biomarkers* van veroudering gevonden (Rattan, 2005; Johnson, 2006). Recente *microarray* studies leidden wel tot de identificatie van een groot aantal weefsel-specifieke *biomarkers* van veroudering (Rodwell *et al.*, 2004; Zahn *et al.*, 2006). Een andere tak van het verouderingsonderzoek heeft zich geconcentreerd op de studie van mutanten met een gewijzigde levensduur. De analyse van een brede waaier aan langlevende mutanten heeft geleid tot een exponentiële toename in de kennis van het verouderingsproces. De studie van kortlevende mutanten bleek minder interessant, omdat deze vaak negatieve pleiotrope effecten vertonen die met natuurlijke veroudering niets te maken hebben. Een manipulatie die een echte vertraging van het verouderingsproces teweegbrengt, zou een krachtig instrument moeten zijn voor de studie van dit proces (Masoro, 1992). De enige interventie die tot op heden in een grote variëteit aan organismen het verouderingsproces kan vertragen, is calorische restrictie.

2.3 Calorische restrictie

Een zeventigtal jaar geleden deden onderzoekers van de universiteit van Cornell een buitengewone ontdekking. McCay en collega's (1935) stelden vast dat ratten die op een calorie-arm dieet geplaatst werden, tot 33% langer leefden (4 jaar i.p.v. 3 jaar). Bovendien bleven de calorisch gerestricteerde dieren langer jeugdig en hadden ze minder ouderdomsgerelateerde ziekten dan de normaal gevoede controles. Sindsdien werd in een groot aantal organismen vastgesteld dat calorische restrictie (CR) systematisch veroudering vertraagt en de levensduur verlengt. Een aantal voorbeelden zijn gisten, nematoden, fruitvliegen, vissen, ratten, muizen, hamsters, honden en mogelijk ook apen (Masoro, 2006). Tegenwoordig wordt CR omschreven als de minimale opname van voedsel, zonder ondervoeding. Een vroegere omschrijving legde de nadruk op de minimale opname van calorieën (Weindruch, 1996), maar of de verminderde calorische waarde van het voedsel ook daadwerkelijk aan de basis ligt van de verlengde levensduur is nog niet duidelijk (zie Hoofdstuk 5).

De potentiële waarde van CR voor het verouderingsonderzoek begon tot de onderzoekswereld door te dringen in de jaren '70. Verschillende waarnemingen leidden tot de conclusie dat CR inderdaad veroudering vertraagt. De beperking van de hoeveelheid voedsel bleek de achteruitgang van verschillende fysiologische processen, die typisch gepaard gaan met veroudering, te vertragen of te verhinderen. CR leidde tot een uitstel in de ontwikkeling van de meeste leeftijd-geassocieerde ziekten en vertraagde de exponentiële stijging van de leeftijdsspecifieke sterfte. Bovendien veroorzaakte CR in verschillende experimentele organismen naast een verlenging van de gemiddelde levensduur ook een verlenging van de maximale levensduur. Dit toont aan dat deze interventie een vertraging van het verouderingsproces veroorzaakt en dus niet enkel de ontwikkeling van ziekten uitstelt. Bijgevolg zou de studie van de mechanismen die aan de basis liggen van de levensduurverlengende effecten van CR inzicht kunnen verschaffen in de biologie van veroudering (Masoro, 1992).

Omdat CR zoveel positieve effecten heeft in zo'n grote verscheidenheid aan organismen, was er de voorbije jaren ook een sterk toegenomen interesse in het potentiële gebruik van calorische restrictie in de mens als een manier om langer gezond te blijven en eventueel ook langer te leven. Zelfs al zou CR geen verlenging van de levensduur veroorzaken in de mens, zou de verminderde frequentie van chronische ziekten toch kunnen bijdragen aan een verbeterde levenskwaliteit op hoge leeftijd. Bovendien zou de preventie van zulke ouderdomsgerelateerde ziekten (hart- en vaatziekten en kanker, maar ook diabetes en neurodegeneratieve ziekten) ook een impact kunnen hebben op de kosten van de ziekteverzekering (Dirks en Leeuwenburgh, 2006). Hoewel de lange-termijn effecten van CR in de mens alsnog onduidelijk zijn, lijkt een groeiende groep individuen voldoende overtuigd van de voordelen van een verminderde voedselopname. Zij hebben zich verenigd in de *Calorie Restriction Society* (www.calorierestriction.org). Hoewel in recente publicaties gewaarschuwd wordt voor het experimenteren met CR (Hopkin, 2003; Dirks en Leeuwenburgh, 2006), legt dit gezelschap zichzelf een calorie-arm dieet op dat een optimale hoeveelheid aan noodzakelijke nutriënten bevat. Ondanks de belangstelling voor CR bij het grote publiek, lijkt het echter onwaarschijnlijk dat veel mensen levenslang een streng dieet zullen kunnen/willen volhouden. Daarom werden in de Verenigde Staten verschillende studies gestart naar CR *mimetics* (Ingram *et al.*, 2006). Deze moleculen hebben als doel bepaalde gezondheidsbevorderende en eventuele levensduurverlengende effecten van CR na te bootsen, zonder dat daarbij minder voedsel moet geconsumeerd worden.

Hoewel verschillende hypothesen naar voor geschoven werden in een poging om te verklaren hoe CR het verouderingsproces vertraagt (zie Hoofdstuk 4), werd nog steeds geen algemeen aanvaard mechanisme beschreven (Partridge *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007).

3 Verouderingstheorieën

3.1 Inleiding

Een theorie die de oorzaak van veroudering tracht te verklaren, moet een antwoord kunnen geven op de vragen waarom individuele organismen een achteruitgang in fysiologische capaciteit vertonen met toenemende leeftijd en waarom de verouderingssnelheid kan verschillen binnen één populatie en tussen verschillende soorten. Tenslotte moet er ook een verklaring gegeven worden voor het feit dat mutaties in één enkel gen en sommige experimentele condities, zoals calorische restrictie, in staat zijn om het begin van het verouderingsproces uit te stellen of de verouderingssnelheid te beïnvloeden (Sohal en Weindruch, 1996).

Sinds het begin van de twintigste eeuw werden er verscheidene theorieën voorgesteld die het ontstaan van veroudering trachtten op te helderen. Een poging van Medvedev (1990) om een overzicht te maken van al deze hypothesen resulteerde in een lijst van meer dan 300 'verouderingstheorieën'. Aangezien onze kennis van het verouderingsproces gestaag toeneemt, werden veel van deze theorieën ondertussen weer afgewezen. De overblijvende worden onderverdeeld in mechanistische en evolutieve theorieën. Mechanistische theorieën trachten een moleculaire verklaring te vinden voor het ontstaan van veroudering, terwijl evolutieve theorieën een verklaring zoeken in termen van selectieve druk op een organisme (Kirkwood en Rose, 1991).

3.2 Mechanistische theorieën

3.2.1 Vrije-radicaaltheorie

3.2.1.1 Ontwikkeling van de theorie

In het begin van de twintigste eeuw postuleerde Pearl zijn *rate of living* hypothese op basis van de observatie dat dieren met een hogere metabole snelheid een kortere levensduur hebben (Pearl, 1928). Deze theorie veronderstelt dat een vitale component (energie) wordt opgebruikt tijdens het leven van een organisme en dat de snelheid waarmee dit gebeurt bepalend is voor zijn levensduur. Op dat moment was echter nog niet geweten welk mechanisme precies de link vormde tussen metabolisme en levensduur. In de jaren vijftig formuleerde Harman zijn vrije-radicaaltheorie door te speculeren dat endogene zuurstofradicalen (*reactive oxygen species* of ROS) continu geproduceerd worden in een cel, met de accumulatie van schade en veroudering als gevolg (Harman, 1956). De theorie won aan geloofwaardigheid met de ontdekking van superoxidedismutase (SOD), een enzym dat de detoxificatie van superoxide anionen katalyseert (McCord en Fridovich, 1969), aangezien dit een indirect doch krachtig bewijs vormde dat cellen inderdaad voortdurend vrije

radicalen produceren. Tegenwoordig worden de *rate-of-living* en vrije-radicaaltheorie vaak verenigd door te veronderstellen dat een lagere metabole snelheid aanleiding geeft tot een lagere productie van ROS en dus geassocieerd zou moeten zijn met een verlengde levensduur (Finkel en Holbrook, 2000; Barja, 2002).

3.2.1.2 Reactieve zuurstofradicalen

Reactieve zuurstofradicalen (ROS) zijn moleculen die één of meer ongepaarde elektronen bevatten en die gemakkelijk met andere moleculen reageren, resulterend in potentieel schadelijke modificaties. ROS is een overkoepelende term die zowel radicale als niet-radicalen derivaten van zuurstofgas (O_2) bevat (Tabel 3.1). Op dezelfde manier wordt de term reactieve stikstofradicalen (RNS) gebruikt om potentieel schadelijke radicale en niet-radicalen modificaties van stikstofgas (N_2) aan te duiden.

Radicalen	Niet-radicalen
Superoxide, $O_2^{\cdot-}$	Waterstofperoxide, H_2O_2
Hydroxyl, OH^{\cdot}	Hypochloriet, $HOCl$
Peroxyl, RO_2^{\cdot}	Ozon, O_3
Alkoxyl, RO^{\cdot}	Singlet zuurstof
Hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}	Peroxynitriet, $ONOO^{\cdot}$

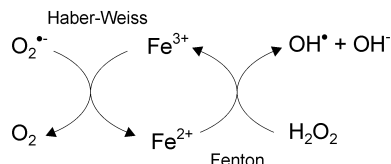
Tabel 3.1: Overzicht van biologisch relevante ROS.

Hoewel O_2 het voornaamste oxidant is in aerobe organismen, is het zelf slechts matig reactief. Dit komt omdat O_2 paramagnetisch is, wat wil zeggen dat zijn twee ongepaarde elektronen een parallelle spin hebben en zich in verschillende orbitalen bevinden. Als zuurstofgas simultaan twee elektronen zou ontvangen, zouden deze een antiparallelle spin moeten bezitten ten opzichte van de ongepaarde elektronen in O_2 . Volgens het Exclusieprincipe van Pauli is dit energetisch een zeer ongunstige situatie. Bijgevolg zal O_2 bij voorkeur elektronen één voor één accepteren via een reeks univalente elektronentransfers. Transitie-metalen bevatten ook ongepaarde elektronen en worden teruggevonden in de actieve centra van veel enzymen. Het zijn belangrijke katalysatoren aangezien hun mogelijkheid om één elektron per keer te accepteren of te doneren de spinrestrictie van O_2 kan omzeilen (Hill, 1981). Omdat de reductie van O_2 tot H_2O vier elektronen vereist, zullen verschillende intermediären kunnen voortkomen uit deze univalente elektronentransfers. Dit zijn het superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), waterstofperoxide (H_2O_2) en het hydroxylradicaal (OH^{\cdot}).

3.2.1.2.1 Het hydroxylradicaal

Het hydroxylradicaal is het meest krachtige oxidant. Het is verantwoordelijk voor de meeste biologische schade en reageert zonder onderscheid met suikers, aminozuren, fosfolipiden, nucleotiden en organische zuren (Halliwell en Gutteridge, 1999; Raha en Robinson, 2000). Blootstelling van levende organismen aan achtergrondhoeveelheden ioniserende straling leidt tot homolytische fessie van zuurstof-waterstof bindingen in water, met de productie van het OH^{\cdot} als gevolg. De metaal-afhankelijke Fentonreactie is echter een meer efficiënte manier om OH^{\cdot} te produceren uitgaande van waterstofperoxide (Fenton, 1894; Halliwell en

Gutteridge, 1984). Tijdens de Fentonreactie worden metaalionen zoals Fe^{2+} en Cu^+ gebruikt om H_2O_2 te reduceren tot OH^\bullet . De gereduceerde vorm van beide metaalionen wordt bekomen via de Haber-Weiss reductie van O_2^\bullet (Fig. 3.1) (Haber en Weiss, 1934; Halliwell en Gutteridge, 1984).



Figuur 3.1: Vorming van het hydroxylradicaal via de gekoppelde Haber-Weiss en Fentonreacties.

Als gevolg van zijn extreme reactiviteit zal OH^\bullet elke molecule in zijn onmiddellijke nabijheid aanvallen zodra het gevormd wordt (Czapski, 1984). OH^\bullet reageert onder andere via waterstof-abstractie en -additie en via elektronentransfer. Deze reacties geven opnieuw aanleiding tot radicalen, maar deze zijn gewoonlijk minder reactief dan het hydroxylradicaal zelf (Halliwell en Gutteridge, 1999).

3.2.1.2.2 Het superoxide anion

Het superoxide anion wordt gevormd door de één-elektron reductie van O_2 . De elektronendonor is gewoonlijk een quinoïde of flavonoïde elektronendrager, hoewel kleine hoeveelheden ook kunnen gegenereerd worden door interactie met transitie-metalen (Pryor, 1986; Fridovich, 1995). O_2^\bullet is slechts matig reactief en kan bijgevolg over een aanzienlijke afstand diffunderen vooraleer het een geschikt doelwit tegenkomt (Halliwell en Gutteridge, 1984). In waterige oplossing wordt het gemakkelijk geprotoneerd tot het veel reactievere hydroperoxylradicaal (HO_2^\bullet). Reacties van superoxide omvatten dismutatie, reductie en oxidatie. Tijdens dismutatie wordt één molecule O_2^\bullet geoxideerd tot O_2 , terwijl een andere gereduceerd wordt tot H_2O_2 . De directe schade die door O_2^\bullet kan veroorzaakt worden is uiterst selectief en gebeurt door reactie met ijzer in ijzer-zwavel bevattende proteïnen zoals aconitase (Flint *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2001). Superoxide reageert ook met stikstofoxide (NO), wat aanleiding geeft tot het zeer reactieve peroxynitriet (ONOO^\bullet) (Fridovich, 1995), en is betrokken bij de vorming van OH^\bullet via de Fentonreactie.

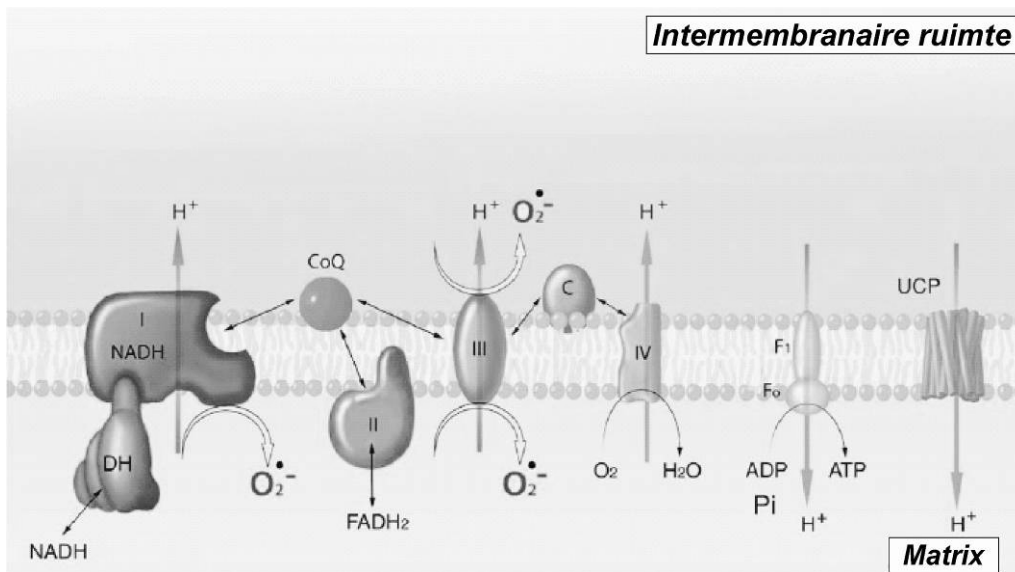
3.2.1.2.3 Waterstofperoxide

Waterstofperoxide wordt zowel in de mitochondriën gevormd door dismutatie van O_2^\bullet , als in de peroxisomen door de werking van het enzym acyl-CoA oxidase dat de eerste stap van de vetzuuroxidatie katalyseert. Tijdens deze initiatiereactie wordt O_2 verbruikt om acyl-CoA om te zetten tot *trans*-2,3-dehydroacyl-CoA (Inestrosa *et al.*, 1979). Net zoals het superoxide anion is ook H_2O_2 slechts weinig reactief. Het is een zwak oxiderend en reducerend agens dat slechts een beperkt aantal enzymen direct kan inactiveren door oxidatie van thiolgroepen in het actieve centrum. Het geraakt gemakkelijk doorheen membranen en kan

dus een heel eind wegdiffrunderen van zijn plaats van vorming, waar het kan omgezet worden tot het zeer schadelijke en veel reactievere hydroxylradicaal.

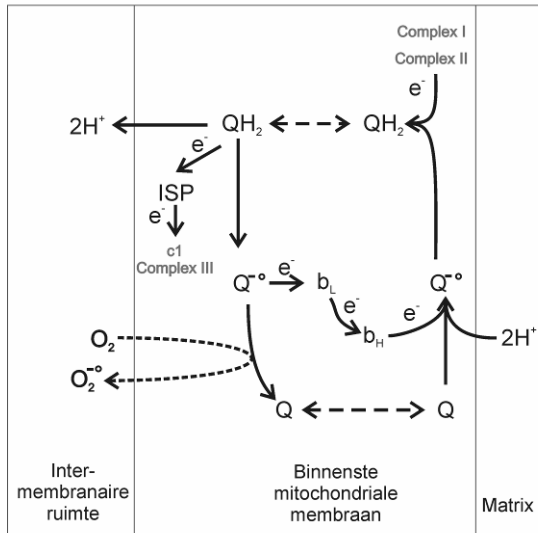
3.2.1.3 Voornaamste plaatsen van ROS productie

De overgrote meerderheid van het superoxide dat door organismen gevormd wordt, is afkomstig van de mitochondriale respiratorische keten, waar de vier-elektronen reductie van O_2 tot H_2O plaatsvindt. Oxidatieve fosforylatie in de mitochondriën wordt uitgevoerd door vier membraangebonden elektronentransportcomplexen (I-IV) en één ATP synthese-complex. Er werd reeds aangetoond dat complex I (NADH oxidoreductase) en complex III (cytochroom c oxidoreductase) verantwoordelijk zijn voor de vorming van superoxide in de mitochondriën door de directe transfer van elektronen naar O_2 (Fig. 3.2) (Cross en Jones, 1991).



Figuur 3.2: Overzicht van de mitochondriale elektronentransportketen. Elektronen afkomstig van complex I of II worden getransfereerd naar complex III en IV, waar zuurstof gereduceerd wordt tot water. Tijdens het elektronentransport worden protonen naar de intermembraire ruimte gepompt. Dit resulteert in de opbouw van een membraanpotentiaal die de productie van ATP ter hoogte van complex V drijft. Superoxide wordt gevormd ter hoogte van de complexen I en III (Balaban *et al.*, 2005).

De exacte plaats van superoxideproductie ter hoogte van complex I is nog steeds onderwerp van discussie (Du *et al.*, 1998; Kushnareva *et al.*, 2002). Zeker is wel dat het superoxide geproduceerd wordt aan de matrixzijde van de mitochondriën (Muller *et al.*, 2004). De aanmaak van superoxide door complex III is beter gedocumenteerd. Hier blijkt de Q-cyclus een rol te spelen (Fig. 3.3). Quinones zijn verantwoordelijk voor de transfer van elektronen van complex I en II naar complex III. De reductie van quinone (Q) gebeurt in twee opeenvolgende stappen (Trumpower, 1990). De eerste één-elektron reductie leidt tot de vorming van het semiquinone anion (QH[•]), terwijl de tweede reductie resulteert in de vorming van ubiquinol (QH₂). Aangezien O_2 beter oplosbaar is in lipiden dan in water (Thomas *et al.*, 2001), zal het O_2 dat opgelost is in de binnenste mitochondriale membraan



Figuur 3.3: Overzicht van de Q-cyclus.

kunnen reageren met QH[•], wat aanleiding geeft tot de vorming van geoxideerd quinone en de productie van superoxide. Dit is voornamelijk het geval wanneer de elektronentransportketen vertraagt tengevolge van een hoge membraanpotentiaal en het semiquinone anion bijgevolg een langere levensduur heeft (Korshunov *et al.*, 1997; Starkov en Fiskum, 2003). Hoewel de kristallografische structuur van complex III doet vermoeden dat superoxide enkel aan de kant van de intermembranaire ruimte kan geproduceerd worden (Iwata *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; St-Pierre *et al.*, 2002; Miwa *et al.*, 2003), werd toch ook O₂^{•-} waargenomen aan de matrixzijde (Muller *et al.*, 2004). Het exacte mechanisme dat aan

de basis hiervan ligt is echter nog onbekend.

Cellen kunnen zichzelf beschermen tegen de overproductie van mitochondriaal superoxide door de activering van ontkoppelingseiwitten. Milde ontkoppeling veroorzaakt een verlaging van de elektrochemische potentiaal en van de productie van superoxide. De superoxide-gemedieerde schade zal daardoor verminderen, maar dit gaat wel gepaard met een lichtjes verlaagde efficiëntie van energieproductie (Skulachev, 1996; Brand *et al.*, 2004).

Superoxide kan ook gevormd worden in microsomale fracties afkomstig van het endoplasmatisch reticulum. Deze fracties bevatten cytochroom *P-450*, een enzym dat verantwoordelijk is voor het verwijderen van toxische componenten. De productie van superoxide kan op twee manieren gebeuren. Enerzijds is de directe reductie van O₂ tot O₂^{•-} mogelijk (Koop, 1992). Anderzijds kunnen elektronen tijdens de hydroxylering van een cytochroom *P-450* substraat weglekken naar zuurstof, met superoxidevorming tot gevolg (Halliwell en Gutteridge, 1999).

Een andere plaats van ROS productie zijn de peroxisomen, waar tijdens de eerste stap van de vetzuuroxidatie H₂O₂ als bijproduct gevormd wordt. Hoewel hun primaire functie het neutraliseren van cytosolisch H₂O₂ is, kunnen peroxisomen zelf een bron van ROS worden, aangezien tijdens veroudering en onder verschillende stresscondities de peroxisomale ROS productie toeneemt terwijl de catalase activiteit kan verminderen (Schrader en Fahimi, 2004).

Naast deze bronnen van ROS bestaan er nog verscheidene andere enzymen die in staat zijn om oxidantia te vormen en dit vaak op een weefsel-specifieke manier (Beckman en Ames, 1998; Jezek en Hlavata, 2005). Een voorbeeld is stikstofoxide (NO) dat in verschillende weefsels gevormd wordt door verschillende vormen van stikstofoxide synthase (NOS). Naast de constitutief geëxprimeerde neuronale en endotheliale NOS, wordt er ook een

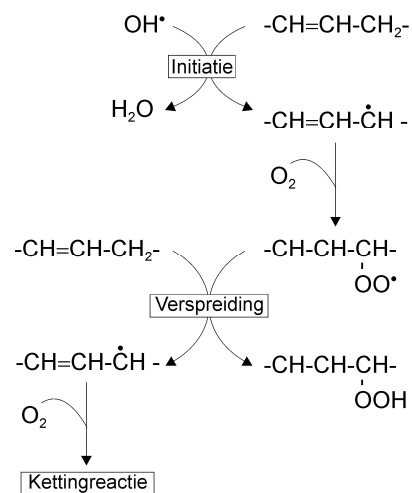
induceerbare vorm geëxprimeerd tijdens ontstekingen. NO wordt ook gevormd in de mitochondriën door een specifiek mitochondriaal NOS (Haynes *et al.*, 2004).

3.2.1.4 Oxidatieve schade aan macromoleculen

Vrije radicalen veroorzaken schade aan DNA, lipiden en eiwitten. Er is toenemend bewijs dat de schade aan DNA en lipiden slechts secundaire processen zijn en dat eiwitten de meest waarschijnlijke initiële doelwitten zijn (Giese *et al.*, 2000; Du en Gebicki, 2004).

Verschillende types van ROS-geïnduceerde eiwitmodificaties werden aangetoond, onder andere het verlies van sulhydryl (-SH) groepen, de vorming van proteïne-proteïne *cross-links* en carbonylgroepen, en peptidefragmentatie (Starke-Reed en Oliver, 1989; Stadtman en Oliver, 1991). Het verlies van -SH groepen is één van de eerste gevolgen van een toename in oxidatieve stress. Carbonylatie van de zijketens van aminozuren is één van de best gekarakteriseerde structurele veranderingen in eiwitten (Stadtman, 2000). Hoewel carbonylatie in principe kan veroorzaakt worden door een brede waaier aan ROS, lijkt plaatsspecifieke metaal-gekatalyseerde oxidatie met de vorming van het zeer reactieve hydroxylradicaal, het meest plausibele mechanisme *in vivo*. Sommige enzymen die ijzer-zwavel clusters bevatten in hun actief centrum, zoals aconitase en fumarase, blijken zeer gevoelig te zijn voor superoxide (Flint *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2001). Gevolgen van oxidatieve schade aan eiwitten zijn onder andere een verlies van functie, foutieve opvouwing en katalytische inactivering (Sohal, 2002).

Schade aan lipiden is een gevolg van de peroxidatie van poly-onverzadigde vetzuren (PUFA's) aanwezig in vele membranen en lipoproteïnen. Meerdere ROS zijn in staat om PUFA's te oxideren, maar OH[•] is het meest krachtige. Lipide peroxidatie (Fig. 3.4) wordt geïnitieerd door de abstractie van een waterstofatoom van een methyleen (-CH₂-) groep. Het resulterende koolstofradicaal reageert gemakkelijk met O₂, wat aanleiding geeft tot de vorming van een peroxyradicaal (RO₂[•]). Peroxyradicalen kunnen een waterstofatoom onttrekken aan een ander lipidemolecule en veroorzaken zo de vorming van een lipide hydroperoxide (LOOH) en een nieuw koolstofradicaal. De eerste valt snel uiteen met de vorming van een alkoxyradicaal (RO[•]) (dat op zijn beurt een waterstofatoom kan onttrekken aan een PUFA), terwijl de laatste opnieuw kan reageren met O₂. Deze reeks van ROS-geïnduceerde peroxidatiereacties wordt een kettingreactie genoemd. Een primair effect van lipideperoxidatie is een verminderde membraanfluiditeit. Dit veroorzaakt een verandering in de eigenschappen van de membranen, wat op zijn beurt kan leiden tot een verlies van membraanintegriteit en schade aan membraangebonden



Figuur 3.4: Mechanisme van lipide peroxidatie.

proteïnen, zoals deze betrokken in ionenkanalen en elektronentransport.

Oxidatieve schade aan nucleïnezuren omvat modificaties van basen en suikergroepen, enkel- en dubbelstrengige breuken en *cross-links* met andere moleculen. Superoxide en waterstofperoxide blijken niet te reageren met DNA. Het hydroxylradicaal daarentegen, valt zowel suikers als purines en pyrimidines aan (Breen en Murphy, 1995; Dizdaroglu *et al.*, 2002). Aangezien DNA in staat is om metaalionen te binden, kan OH[•] ter hoogte van het DNA zelf geproduceerd worden via de Fentonreactie. Schade aan suikers wordt veroorzaakt door de vorming van koolstofradicalen via abstractie van waterstof, gevolgd door een serie reacties die uiteindelijk leiden tot de fragmentatie van deoxyribose. Schade aan de basen wordt voornamelijk geïnitieerd ter hoogte van de elektronenrijke dubbele bindingen, wat aanleiding geeft tot een variëteit aan modificaties zoals 8-hydroxyguanine, 8-hydroxyadenine, cytosine glycol en thymine glycol (Halliwell en Gutteridge, 1999). DNA schade, en basemodificaties in het bijzonder, kan mutaties, replicatiefouten en genomische instabiliteit veroorzaken en is bovendien geassocieerd met carcinogenese (Cooke *et al.*, 2003). Mitochondriaal DNA is gevoeliger voor oxidatie dan nucleair DNA wegens de nabijheid van de superoxide-producerende elektronentransportketen. Bovendien wordt mitochondriaal DNA niet beschermd door histonen. Naast ROS zijn ook RNS betrokken bij het veroorzaken van schade aan DNA (Brown en Borutaite, 2001).

3.2.1.5 Verdedigingsmechanismen tegen oxidantia

Met de stijging van het O₂-gehalte in de atmosfeer ongeveer twee miljard jaar geleden, werden levende organismen geconfronteerd met nieuwe mogelijkheden en uitdagingen. Zij werden echter ook gedwongen om defensiemechanismen te ontwikkelen tegen de toxiciteit van dit paramagnetische gas. Deze defensiemechanismen omvatten beschermende moleculen zoals *heat shock* proteïnen en chaperonnes, enzymen met antioxidatieve activiteit, moleculen met een laag moleculair gewicht en proteïnen die metaalionen binden waardoor deze niet langer beschikbaar zijn voor de katalyse van reacties met vrije radicalen (Fridovich, 1989; Halliwell en Aruoma, 1991). Oxidatieve stress treedt op wanneer ROS niet adequaat verwijderd worden. Dit kan gebeuren wanneer de aanwezige antioxidantia opgebruikt zijn en/of als de vorming van ROS toeneemt tot een niveau dat niet meer kan opgevangen worden door de defensiesystemen (Sies, 1991).

3.2.1.5.1 *Enzymatische antioxidantia*

De drie belangrijkste enzymen met antioxidatieve eigenschappen die aanwezig zijn in alle eukaryote cellen zijn superoxidedismutase (SOD), catalase en glutathion (GSH) peroxidase.

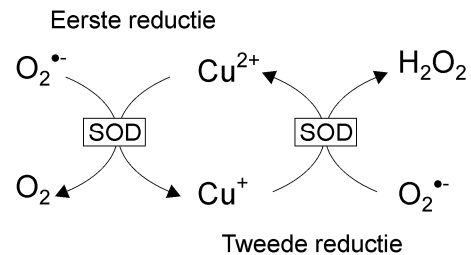
De superoxidedismutasen vormen een groep van metallo-enzymen die de dismutatie van superoxide tot H₂O₂ katalyseren (Fig. 3.5).



Figuur 3.5: De dismutatie van superoxide door SOD.

Drie types SOD worden onderscheiden, afhankelijk van het metaalion aanwezig in het actieve centrum. Dit zijn Cu/ZnSOD, MnSOD en FeSOD. Cu/ZnSOD werd eerst beschreven als een koper-houdend proteïne dat op het eerste zicht geen enzymatische activiteit vertoonde. In de jaren zestig rapporteerden McCord en Fridovich echter dat het eiwit werkt als een superoxidedismutase (McCord en Fridovich, 1969). Het enzym bevindt zich voornamelijk in het cytosol, hoewel kleine hoeveelheden ook voorkomen in de lysosomen, de kern en de ruimte tussen de binnenste en de buitenste mitochondriale membranen. Een ander type Cu/ZnSOD is exclusief extracellulair.

Het koperion in het actieve centrum is betrokken in de alternerende oxidatie en reductie tijdens dismutatie (Fig. 3.6). In een eerste stap wordt Cu^{2+} van SOD gereduceerd tot Cu^+ , terwijl superoxide geoxideerd wordt tot O_2 . Tijdens de volgende stap wordt een tweede molecule $\text{O}_2^{\bullet-}$ gebruikt om Cu^+ terug te oxideren tot Cu^{2+} , waarbij het zelf gereduceerd wordt tot H_2O_2 . Het zinkion is niet betrokken bij het katalytisch mechanisme, maar zorgt voor de stabilisatie van het enzym.



Figuur 3.6: Reactiemechanisme van Cu/ZnSOD.

MnSOD wird in eerste instantie geïsoleerd uit *E. coli* en is wijdverspreid in bacteriën, planten en dieren. In de meeste dierlijke weefsels bevindt het zich in de mitochondriën. MnSOD katalyseert dezelfde reactie als Cu/ZnSOD (Fridovich, 1995). FeSOD is aanwezig in het cytoplasma van veel bacteriën en de chloroplasten van planten. De katalytische activiteit is dezelfde als die van Cu/ZnSOD. Sommige bacteriën hebben ook een zogenaamd cambialistisch SOD dat zowel functioneel is met ijzer als met mangaan in het actief centrum (Gabbianelli *et al.*, 1995).

Catalasen zijn haemproteïnen die de dismutatie van H_2O_2 tot water en zuurstofgas katalyseren (Fig. 3.7).



Figuur 3.7: De dismutatie van waterstofperoxide door catalase.

De catalase activiteit van dierlijke en plantaardige weefsels bevindt zich bijna volledig in de peroxisomen (Chance *et al.*, 1979), hoewel sommige organismen ook een cytosolisch catalase hebben (Radi *et al.*, 1991; Bulitta *et al.*, 1996). Peroxisomen bevatten veel enzymen die verantwoordelijk zijn voor de productie van H_2O_2 in een cel, zoals glycolaat oxidase, uraat oxidase en flavoproteïne oxidase die betrokken zijn bij de β -oxidatie van vetzuren. Deze metabole weg komt ook voor in de mitochondriën waar de flavoproteïnen hun elektronen doneren aan de elektronentransportketen. In de peroxisomen reageren de elektronen echter met O_2 en geven zo aanleiding tot het ontstaan van H_2O_2 . Het lijkt dan ook logisch dat deze enzymen samengebracht werden in een organel dat een grote capaciteit bezit om H_2O_2 te vernietigen (Halliwell en Gutteridge, 1999). Verscheidene bacteriën hebben een pseudocatalase, een H_2O_2 -afbrekend enzym dat mangaan in het actieve centrum bevat in plaats van een haemgroep.

Peroxidasen zijn eveneens verantwoordelijk voor de verwijdering van H_2O_2 , maar de reductie is nu gekoppeld aan de oxidatie van een ander substraat. Glutathione peroxidase (GPX) katalyseert de eliminatie van H_2O_2 door gebruik te maken van gereduceerd glutathione (GSH) als cofactor (Chance, 1979). Glutathione peroxidasen zijn wijdverspreid in dierlijke weefsels. Behalve waterstofperoxide kunnen ze ook andere peroxiden vernietigen, waarbij deze laatste worden omgezet tot hun overeenkomstig alcohol (Fig. 3.8).



Figuur 3.8: De reductie van peroxiden door glutathion peroxidase.

Glutathione peroxidasen zijn opgebouwd uit vier subunits die elk een seleniatoom in hun actief centrum bezitten. In tegenstelling tot catalase, dat bijna volledig gelokaliseerd is in de peroxisomen, wordt GPX voornamelijk teruggevonden in het cytosol en de mitochondriën.

Peroxiredoxines, een familie van peroxidasen die thioredoxine gebruiken als cofactor, katalyseren de reductie van onder andere waterstofperoxide en peroxyntriet. Zij zijn gelokaliseerd in de mitochondriën, de peroxisomen, het cytosol en de nucleus (Wood *et al.*, 2003). Andere peroxidasen zijn cytochroom c peroxidase (gist), ascorbaat peroxidase (planten) en NADPH peroxidase (*E. coli*) (Fridovich, 1998).

3.2.1.5.2 Niet-enzymatische antioxidantia

Naast zijn rol als een cofactor voor glutathion peroxidase, kan GSH ook een variëteit aan ROS elimineren door er rechtstreeks mee te reageren. Deze reacties geven aanleiding tot de vorming van thiyl radicalen (GS^\bullet), die op hun beurt superoxide genereren (Fig. 3.9). Dit wordt tenslotte geneutraliseerd door SOD. GSH wordt beschouwd als de belangrijkste thiol-disulfide redox buffer van de cel (Masella *et al.*, 2005).



Figuur 3.9: Vorming van superoxide tijdens de eliminatie van ROS door GSH.

Thioredoxines zijn kleine cysteine-rijke proteïnen die geconcentreerd zitten in het endoplasmatisch reticulum. Net zoals glutathion zijn ze verantwoordelijk voor de reductie van disulfidebruggen van eiwitten die onderhevig zijn aan oxidatieve stress. In tegenstelling tot GSH, dat intermoleculaire disulfiden vormt, produceren de thioredoxines echter hoofdzakelijk intramoleculaire disulfiden (Tanaka *et al.*, 2000).

Andere moleculen met antioxidatieve eigenschappen die *in vivo* gevormd worden zijn onder andere ubiquinol en melanines (Halliwell en Gutteridge, 1999). Hoewel ubiquinol verantwoordelijk is voor het lekken van elektronen naar O_2 tijdens het mitochondriaal elektronentransport, heeft het ook antioxidatieve eigenschappen. Zijn fenolische waterstof atomen kunnen overgedragen worden naar koolstof en zuurstof radicalen, waardoor deze omgezet worden tot niet-radicalen moleculen. In het resulterende semiquinone anion wordt het ongepaarde elektron gedelokaliseerd over de fenolische ring, wat het einde van de ketteringreactie betekent. Melanines (pigmenten) zijn grote moleculen die ontstaan door de

polymerisatie van quinones en semiquinones. Zij bevatten veel ongepaarde elektronen en doen als dusdanig dienst als 'vergaarbak' voor radicalen.

Sommige antioxidatieve moleculen kunnen niet *in vivo* gesynthetiseerd worden en moeten opgenomen worden via de voeding. Vitamine C (ascorbaat) is een belangrijk water-oplosbaar antioxidant in biologische systemen (Frei *et al.*, 1990). Het werkt door ROS en RNS direct te neutraliseren, maar kan ook andere kleine antioxidantia regenereren. Bovendien interageert het met transitie-metaal-ionen zoals ijzer en koper in het actieve centrum van hydroxylasen en oxygenasen. Een tekort aan vitamine C veroorzaakt een daling in de activiteit van deze enzymen, wat scheurbuik tot gevolg heeft (Levine, 1986).

Vitamine E is een krachtig vet-oplosbaar antioxidant dat beschouwd wordt als het belangrijkste membraan-gebonden antioxidant in de cel (Burton en Ingold, 1989). Zijn voornaamste functie is bescherming tegen lipide peroxidatie. Vitamine E komt voor onder acht verschillende vormen, waarvan α -tocopherol de meest actieve is.

Carotenoïden zijn pigmenten die voorkomen in planten en microorganismen. In planten staan ze in voor het onschadelijk maken van ROS die gevormd worden tijdens de fotosynthese. Hun antioxidant capaciteit is een gevolg van de aanwezigheid van dubbele bindingen, wat de delocalisatie van ongepaarde elektronen mogelijk maakt (Mortensen *et al.*, 2001).

Polyfenolen zijn een veel voorkomende groep van plantaardige metabolieten en maken integraal deel uit van het menselijke dieet. Hun antioxidant activiteit omvat de inhibitie van radicale kettingreacties en de binding van redox-actieve metaal-ionen (Rice-Evans, 2001).

3.2.1.5.3 Regulatie van metaal-ionen

Net zoals zuurstof zijn ijzer en koper noodzakelijk, maar tegelijk ook potentieel gevaarlijk voor het menselijk lichaam (Halliwell en Gutteridge, 1990). Hun capaciteit om één-elektron transfers te ondergaan maakt het mogelijk om deel te nemen aan de omzetting van H_2O_2 naar OH^\bullet en om het uiteenvallen van lipide peroxiden tot alkoxyl en peroxy radicalen te katalyseren. Het is bijgevolg van groot belang dat organismen de beschikbaarheid van deze metaal-ionen zorgvuldig reguleren. Het capteren van metalen in proteïnen maakt hen minder efficiënt als katalysatoren van radicale reacties. Ijzer komt gewoonlijk in circulatie gebonden aan transferrine. Cellen die ijzer nodig hebben expresseren transferrine receptoren aan hun oppervlak. Transferrine zal vervolgens aan deze receptoren binden en opgenomen worden in de cel via receptor-gemedieerde endocytose (Crichton en Charloteaux-Waters, 1987). Het opgenomen ijzer wordt tenslotte opgeslagen in de cel gebonden aan ferritine. Koper wordt geabsorbeerd uit het dieet en wordt gebonden aan albumine. Dit wordt opgenomen door de lever, waar het geïncorporeerd wordt in het proteïne caeruloplasmine (Gutteridge en Stocks, 1981). Andere proteïnen die betrokken zijn bij de regulatie van metaal-ionen zijn de cysteïne-rijke metallothioneïnen. Captatie van metaal-ionen is een belangrijk mechanisme om lipide peroxidatie en DNA fragmentatie te voorkomen (Sies, 1997).

3.2.1.6 Herstel van oxidatieve schade

Aangezien het onderscheppen van ROS door de verschillende antioxidatieve systemen niet altijd 100% efficiënt is, is oxidatieve schade aan macromoleculen onvermijdelijk. Bijgevolg ontwikkelden organismen verscheidene mechanismen die instaan voor het herstel van deze schade.

De verschillende DNA herstelmechanismen zijn samen in staat om zo goed als alle DNA schade te herstellen. Er worden minstens vier mechanismen onderscheiden. Bij *Nucleotide Excision Repair* (NER) wordt de dubbele helix van het DNA geopend aan weerszijde van het defect. Na de verwijdering van het beschadigde oligonucleotide wordt de resulterende opening weer opgevuld door DNA synthese, gevolgd door ligatie van de strengen (De Boer en Hoeijmakers, 2000; Hoeijmakers, 2001). Oxidatieve schade aan basen en suikers wordt gewoonlijk hersteld via *Base Excision Repair* (BER) en wordt geïnitieerd door de activiteit van een glycosylase dat de glycosidische binding verbreekt tussen de beschadigde base en de suiker. Hierdoor wordt de base verwijderd en ontstaat er een abasische (AP) plaats die herkend wordt door het AP endonuclease dat de fosfodiëster binding verbreekt. Dit resulteert tenslotte in een opening van één nucleotide dat opnieuw gevuld en geligeerd wordt (Bohr, 2002). Dubbelstrengige breuken kunnen hersteld worden via homologe recombinatie en *end joining*.

De zwavel-bevattende aminozuren cysteïne en methionine zijn het meest gevoelig voor oxidatie, maar zijn tegelijk ook de enige aminozuren die kunnen hersteld worden na oxidatieve beschadiging. Dit gaat gepaard met de reductie van disulfidebruggen door glutathion en thioredoxine. De meeste geoxideerde eiwitten worden echter afgebroken door het proteasoom (Davies, 2001). In de mitochondriale matrix is het Lon protease verantwoordelijk voor de selectieve afbraak van geoxideerde proteïnen (Bota en Davies, 2002). Chaperonne-gemedieerde autofagie is een ander mechanisme dat geactiveerd wordt als respons op oxidatieve stress (Kiffin *et al.*, 2004).

De producten van lipide peroxidatie in membranen kunnen worden omgezet tot hun alcohol door de activiteit van fosfolipide hydroperoxide glutathion peroxidasen. Ze kunnen ook uit de membranen vrijgesteld worden door fosfolipasen, waarna ze verwijderd worden door glutathion peroxidase (Halliwell en Gutteridge, 1999).

3.2.1.7 ROS als signalisatiemoleculen

Er werd lang gedacht dat ROS slechts gevaarlijke nevenproducten zijn van het metabolisme, die potentieel schade kunnen aanbrengen aan macromoleculen. Er is echter toenemend bewijs dat zij ook een rol spelen als signalisatiemoleculen in diverse cellulaire processen. Vooral H_2O_2 en stikstofoxide zijn in deze context belangrijk (Esposito *et al.*, 2004; de Magalhães en Church, 2006). Zo werd er onder andere aangetoond dat redox reacties de activiteit van verschillende transcriptiefactoren kunnen beïnvloeden, wat resulteert in de modulatie van genexpressie en veranderingen op cellulair niveau. ROS kunnen ook

kortstondig geïnduceerd worden door groeifactoren, waarna ze dienst doen als signaalmoleculen tijdens cellulaire groei en proliferatie (Soberman, 2003), en zijn ook betrokken bij mitogene signalisatie en kanker. Hoewel het exacte mechanisme nog onduidelijk is, kunnen ook apoptose en necrose gereguleerd worden door ROS (Kwon *et al.*, 2003). Verder doen ROS ook dienst als signaalmoleculen tijdens de verschillende stadia van ontwikkeling en worden ze gebruikt in het immuunsysteem, waar macrofagen en neutrofielen ROS produceren teneinde bepaalde bacteriën te doden.

3.2.1.8 Evaluatie van de vrije-radicaaltheorie

Tot hiertoe werden er grote hoeveelheden correlatieve bewijzen gevonden die de vrije-radicaaltheorie indirect ondersteunen. De graduele accumulatie van lipofuscines, die hoofdzakelijk bestaan uit *cross-links* van lipide- en proteïneresiduen, werd aangetoond in een grote verscheidenheid aan soorten zoals o.a. nematoden, fruitvliegen, ratten en bijen (Beckman en Ames, 1998). Er werd gesuggereerd dat lipofuscine accumulatie een *biomarker* van lipide peroxidatie is, en bijgevolg ook een *biomarker* van veroudering (Yin, 1996). De oxidatieve modificatie van verschillende aminozuren blijkt exponentieel toe te nemen in functie van de leeftijd in verschillende weefsels van zoogdieren (Stadtman, 1992). Op dezelfde wijze blijkt ook de carbonylatie van eiwitten in de huisvlieg exponentieel toe te nemen met de leeftijd (Sohal *et al.*, 1993). De snelheid waarmee $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 gevormd worden lijkt ook tamelijk consistent toe te nemen met toenemende leeftijd, wat suggereert dat de verhoogde productie van ROS verantwoordelijk is voor de leeftijdsgerelateerde accumulatie van oxidatieve schade aan macromoleculen (Sohal, 2002). Knaagdieren die onderworpen werden aan calorische restrictie hebben een verlengde levensduur en produceren minder $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . Bovendien vertonen ze een tragere accumulatie van oxidatieve schade (Sohal en Weindruch, 1996).

Correlatie is echter niet hetzelfde als causaliteit. Oxidatieve schade zou evengoed een gevolg kunnen zijn van veroudering in plaats van een oorzaak. Er werden reeds verscheidene pogingen ondernomen om de vrije-radicaaltheorie direct te testen door het niveau aan oxidantia te manipuleren in verschillende modelorganismen (voor een overzicht, zie: Sohal *et al.*, 2002; de Magalhães, 2005; de Magalhães en Church, 2006). Tot hiertoe zijn de resultaten echter teleurstellend. In een reeks experimenten met *Drosophila* werd aangetoond dat de overexpressie van Cu/ZnSOD en MnSOD een verlengde levensduur tot gevolg heeft (Parkes *et al.*, 1998; Sun en Tower, 1999; Sun *et al.*, 2002). Er werd echter gesuggereerd dat dit effect gekoppeld was aan de ongewoon korte levensduur van de controlestocks. Het experiment werd daarom herhaald met langlevende vliegen als controle, waarna er geen significant effect meer kon waargenomen worden op de levensduur (Orr *et al.*, 2003).

Transgene muizen die Cu/ZnSOD (Huang *et al.*, 2000), glutathion peroxidase (McClung *et al.*, 2004) of catalase (Schriner *et al.*, 2000) tot overexpressie brengen hebben geen verlengde levensduur. Muizen die heterozygoot zijn voor het *Sod2* gen werden gebruikt in een studie die het effect van een levenslange verminderde MnSOD activiteit wilde nagaan. Hoewel

deze muizen volledig normaal lijken, hebben ze slechts 50% van de wild type MnSOD activiteit in al hun weefsels. De dieren vertonen meer DNA schade en hebben een verhoogde kans op kanker, maar toch blijkt dit geen invloed te hebben op het verouderingsproces (Van Remmen *et al.*, 2003). Omgekeerd leidt interferentie met de werking van het mitochondriaal DNA polymerase tot muizen die sneller verouderen tengevolge van accumulatie van mutaties in het mitochondriaal DNA (Trifunovic *et al.*, 2004), maar dit gaat niet gepaard met een toename in ROS productie of oxidatieve schade (Kujoth *et al.*, 2005).

In nematoden werd de vrije-radicaaltheorie getest door toediening van de synthetische antioxidantia EUK-8 en EUK-134, die beide *in vivo* SOD en catalase activiteit hebben. Aanvankelijk werd gerapporteerd dat deze *mimetics* de levensduur van *C. elegans* konden verlengen (Melov *et al.*, 2000), maar dit kon niet in andere laboratoria herbevestigd worden. Hoewel behandeling met deze *mimetics* leidde tot een dosis-afhankelijke toename in SOD activiteit, werd er geen verlenging van de levensduur waargenomen (Keaney en Gems, 2003; Keaney *et al.*, 2004). Ook in *Drosophila melanogaster* en *Musca domestica* werd na toediening van de synthetische antioxidantia geen verlenging van de wild type levensduur waargenomen (Bayne en Sohal, 2002; Magwere *et al.*, 2006).

Deze resultaten illustreren duidelijk dat er tot nog toe geen bewijs kon gevonden worden voor een oorzakelijk verband tussen de productie van ROS en de activiteit van de verschillende antioxidantensystemen enerzijds en het verouderingsproces anderzijds. Het feit dat er in verschillende modelsystemen geen correlatie is tussen de snelheid van verouderen en het niveau van antioxidantia, suggereert dat de beschermingssystemen tegen oxidatieve stress reeds geoptimaliseerd zijn in deze organismen (Keaney *et al.*, 2004; de Magalhães en Church, 2006). Bovendien lijkt er in een aantal organismen ook geen negatieve correlatie te bestaan tussen de metabole snelheid, die gerelateerd werd aan de snelheid van ROS productie in de mitochondriën, en de levensduur. Integendeel, recente experimenten in vliegen, wormen en muizen tonen aan dat een verlengde levensduur geassocieerd is met een verhoogde metabole snelheid (Houthoofd *et al.*, 2002a; Houthoofd *et al.*, 2002b; Hulbert *et al.*, 2004; Speakman, 2004). Dus, hoewel er een verband lijkt te zijn tussen de accumulatie van oxidatieve schade en veroudering, blijken het zuurstofmetabolisme en de productie van energie in de mitochondriën hier toch niet de primaire oorzaak van te zijn (de Magalhães en Church, 2006).

3.2.2 Telomeerverkorting

Telomeren vormen de uiteinden van lineaire eukaryote chromosomen en bestaan in zoogdieren uit tandem herhalingen van (TTAGGG)_n (Blackburn en Szostak, 1984; Moyzis *et al.*, 1988). Zij staan in voor het behoud van de integriteit van de chromosomale uiteinden door het verhinderen van degradatie, recombinatie en *end-joining* reacties (Shay en Wright, 2005). De uiteinden van telomeren worden beschermd door telomeer-bindende eiwitten en vormen een speciale structuur die de t-lus genoemd wordt (de Lange, 2004). Aangezien DNA polymerase niet in staat is om de uiteinden van chromosomen te repliceren (einde-

replicatieprobleem), zullen er tijdens elke celdeling stukjes van de telomeren verloren gaan (Olovnikov, 1973).

In de vroege jaren zestig beschreef Hayflick voor het eerst dat menselijke fibroblasten in celcultuur een beperkt aantal delingen ondergaan (Hayflick-limiet), waarna een verouderingsprogramma geactiveerd wordt (Hayflick en Moorhead, 1961). Deze waarneming wordt *in vitro* replicatieve senescentie genoemd. De link tussen het verlies van telomeren en replicatieve senescentie werd vervolgens gelegd door te suggereren dat telomeren verkorten tot zij een kritieke lengte bereiken, waarna de celcyclus stopt en een verouderingsprogramma geïnitieerd wordt (Harley *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 1992). Deze hypothese werd later uitgebreid door te postuleren dat het verlies van telomeren ook een oorzaak zou kunnen zijn van veroudering in organismen (Timiras, 1994; Campisi, 1997).

Telomerase is een ribonucleoproteïne dat compenseert voor het einde-replicatieprobleem door zijn RNA component te gebruiken als sjabloon voor de synthese van telomere herhalingen ter hoogte van het 3' uiteinde van chromosomen (Greider en Blackburn, 1985). Telomerase activiteit is essentieel in prolifererende cellen zoals de geslachtscellen en stamcellen (Wright *et al.*, 1996), maar is niet aanwezig in de meeste adulte, somatische cellen. Kankercellen, die als onsterfelijk beschouwd worden, blijken ook actief telomerase te bevatten, wat opnieuw suggereert dat telomerase activiteit en bijgevolg de lengte van de telomeren een invloed heeft op cellulaire veroudering (Kim *et al.*, 1994; Broccoli *et al.*, 1995).

Tot hiertoe is er echter zo goed als geen direct bewijs gevonden voor het bestaan van replicatieve senescentie *in vivo* (Goyns en Lavery, 2000; Shay en Wright, 2005). De meeste adulte somatische cellen zijn postmitotisch en telomerase-negatief en ondergaan bijgevolg geen verkorting van de telomeren. Celtypes die slechts een beperkt aantal delingen ondergaan hebben ook geen telomerase activiteit, maar zij bereiken nooit de Hayflick-limiet. Verder konden verschillende studies geen verband aantonen tussen telomerase activiteit en veroudering van cellen *in vivo*. Hoewel muizen uitzonderlijk lange telomeren hebben, met een lengte van 20 tot 150 kb (Kipling en Cooke, 1990), ligt hun maximale levensduur toch 40x lager dan die van de mens, die een telomeerlengte heeft van 15 tot 24 kb (de Lange *et al.*, 1990). Bovendien kunnen de telomeren van verschillende muizensoorten met dezelfde maximale levensduur sterk in lengte variëren (Greider, 1996). Telomerase-deficiënte muizen hebben abnormaal korte telomeren en blijken tekenen te vertonen van versnelde veroudering. Deze kenmerken worden echter pas zichtbaar in de derde generatie (Kipling en Faragher, 1999; Rudolph *et al.*, 1999). In *C. elegans* tenslotte, een organisme dat volledig opgebouwd is uit postmitotische cellen, kon in een recente studie geen verband aangetoond worden tussen de lengte van de telomeren en de levensduur (Raices *et al.*, 2005).

3.3 Evolutieve theorieën

Omwille van zijn degeneratieve natuur is veroudering moeilijk te verenigen met de evolutieleer. Toch trachten verschillende theorieën om beide met elkaar te verzoenen. De initiële veronderstelling dat veroudering onlosmakelijk verbonden is met het leven, bleek geen stand te houden. Hoewel veroudering wijdverspreid is, blijkt het toch niet universeel te zijn onder multicellulaire organismen (Finch, 1990). *Hydra* bijvoorbeeld, is in staat om zichzelf te regenereren uitgaande van bijna elk onderdeel van zijn structuur en vertoont geen enkele leeftijdsgerelateerde achteruitgang (Martinez, 1998). Ook kankercellen lijken te ontsnappen aan het verouderingsproces. De ontdekking van een groot aantal mutaties die in eenvoudige modelorganismen de levensduur kunnen beïnvloeden en de vaststelling dat de levensduur van organismen varieert over een grootteorde van 1 000 000, heeft geleid tot de veronderstelling dat veroudering een geprogrammeerd proces is. Het is echter hoogst onwaarschijnlijk dat specifieke verouderingsgenen zouden ontstaan zijn. Ten eerste zijn wilde populaties onderhevig aan een zeer hoge mate van extrinsieke mortaliteit (tengevolge van voedselschaarste, ziekte, koude, predatie, enz.), waardoor individuen zelden oud genoeg worden om ook effectief kenmerken van veroudering te vertonen. Ten tweede zouden individuen met een mutatie in hun verouderingsprogramma aanzienlijk fitter zijn dan de rest van de populatie (omdat dit gepaard zou gaan met een verlenging van de reproductieve periode), wat de verspreiding van deze mutatie in de hand zou moeten werken. Tenslotte werden er inderdaad veel mutaties gevonden die de levensduur van bijvoorbeeld *C. elegans* kunnen verlengen, maar geen enkele blijkt in staat om het verouderingsproces volledig stil te leggen (Kirkwood, 2005). Genetische factoren blijken dus onrechtstreeks wel een zekere rol te spelen bij veroudering (Finch en Tanzi, 1997), maar omdat organismen genetisch geprogrammeerd zijn om te reproduceren (en niet om te verouderen/sterven), moet het verouderingsproces ontstaan zijn als een neveneffect van iets anders (Hart en Turturro, 1987; Partridge en Gems, 2002; de Magalhães en Church, 2005).

Als veroudering geen genetisch geprogrammeerd proces is, hoe is het dan geëvolueerd? Een aanwijzing kwam er met de observatie van Haldane (1941) dat patiënten met de ziekte van Huntington, een genetische ziekte die leidt tot zware geestesziekte en uiteindelijk de dood, pas later in hun leven ziek werden en dat de mutatie die de ziekte veroorzaakt dominant is. Deze dominant lethale mutatie bleek in een populatie behouden te kunnen blijven omdat de effecten ervan pas zichtbaar werden na het beëindigen van de reproductie, als de selectiedruk sterk verminderd is. Dit bracht Haldane tot de suggestie dat veroudering het gevolg is van mutaties met effecten op latere leeftijd, waardoor zij ontsnappen aan natuurlijke selectie. Drie verouderingstheorieën vloeiden voort uit de waarnemingen van Haldane.

In 1952 formuleerde Medawar zijn mutatie-accumulatietheorie. Deze theorie poneert dat veroudering veroorzaakt wordt door de accumulatie van mutaties met nefaste effecten op latere leeftijd, als de kracht van natuurlijke selectie zwak is. Indien een individu lang genoeg kan ontsnappen aan de dood, kan het deze geaccumuleerde mutaties ervaren als veroudering. Deze theorie heeft echter weinig experimentele bijval gekregen.

De antagonistische pleiotropietheorie (Williams, 1957) veronderstelt dat er mutaties bestaan met pleiotrope effecten op verschillende leeftijden. Dit betekent dat een mutatie met

gunstige effecten op jonge leeftijd, maar met schadelijke effecten op latere leeftijd een selectief voordeel zal opleveren. Hoewel gegevens van verschillende modelorganismen erop lijken te wijzen dat levensduurverlengende mutaties inderdaad gepaard gaan met een tragere groei en een verlaagde fertiliteit, is er weinig of geen bewijs voor het bestaan van natuurlijke polymorfismen (Leroi *et al.*, 2005). Een belangrijke voorspelling van de antagonistische pleiotropietheorie is dat het niveau van extrinsieke mortaliteit de drijvende kracht is in de evolutie van de levensduur (Kirkwood en Rose, 1991). Het is inderdaad zo dat soorten die aanpassingen zoals vleugels (vogels en vleermuizen), een schild (schildpadden) of grote hersenen (mens) hebben ontwikkeld om de omgevings-afhankelijke mortaliteit te verlagen, gewoonlijk ook een langere levensduur hebben. Een ander voorbeeld van het feit dat veroudering vertraagt in een veiligere omgeving is het verschil in levensduur tussen vasteland- en eilandpopulaties van buidelratten. De eilandpopulatie werd niet belaagd door roofdieren en bleek trager te verouderen (Austad, 1993).

De *disposable soma* theorie kan beschouwd worden als een speciaal geval van de antagonistische pleiotropietheorie en tracht een antwoord te vinden op de vraag hoe de beschikbare middelen het best verdeeld worden tussen behoud van de soma en reproductie (Kirkwood, 1977; Kirkwood en Holliday, 1979; Kirkwood, 1997). De essentie van de theorie is dat de soma in goede conditie moet blijven tot na de reproductie. Investeren in een beter behoud dan dit wordt beschouwd als verspilling (Kirkwood en Rose, 1991). Twee voorspellingen komen voort uit de *disposable soma* theorie. Ten eerste is veroudering het resultaat van de accumulatie van schade aan cellen en macromoleculen. Ten tweede kunnen verschillen in levensduur tussen soorten verklaard worden door hun verschillende capaciteit om zichzelf te handhaven en schade te herstellen (Kirkwood en Austad, 2000; Kirkwood, 2002). Een groot aantal vergelijkende studies ondersteunt dit idee. Zo werd bijvoorbeeld aangetoond dat celculturen afkomstig van langlevende soorten een hogere stressresistentie hebben dan culturen die afkomstig zijn van korter-levende soorten (Martin *et al.*, 1996; Ogburn *et al.*, 1998; Kapahi *et al.*, 1999). Ook werd aangetoond dat de capaciteit om DNA te herstellen gecorreleerd is met de levensduur in zoogdieren (Promislow *et al.*, 1995).

4 Veroudering en calorische restrictie in de nematode *Caenorhabditis elegans*

4.1 De biologie van *C. elegans*

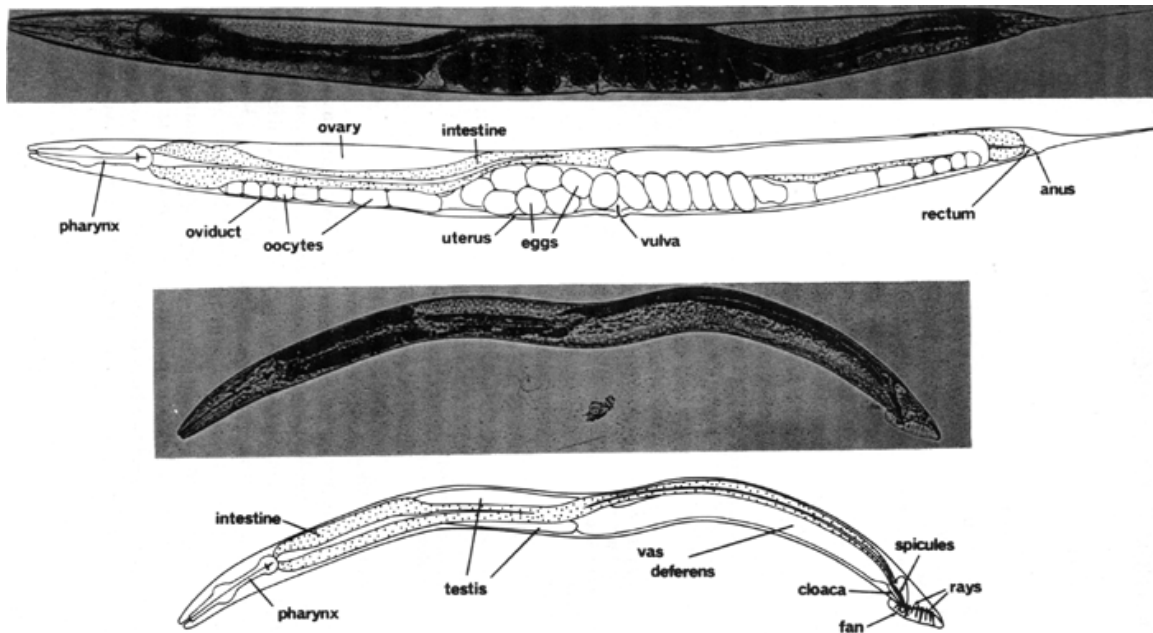
4.1.1 Inleiding

C. elegans is een vrij-levende nematode die voorkomt in de bodem en deel uitmaakt van de familie van de Rhabditidae. Het is een eenvoudig multicellulair organisme dat opgebouwd is uit een klein aantal cellen (959 somatische cellen in de adulte hermafrodiet). De somatische cellen zijn postmitotisch en de enige cellen die nog kunnen delen zijn de geslachtscellen (Gershon en Gershon, 2002). De wild type stam N2, oorspronkelijk geïsoleerd uit compost voor paddestoelen (Riddle *et al.*, 1997), werd geïntroduceerd door Brenner die dit organisme voor het eerst gebruikte als model voor de studie van dierlijke ontwikkeling (Brenner, 1974). Zijn beperkte grootte (1-1.5 mm), snelle levenscyclus (3 dagen), korte levensduur (2 à 3 weken) en makkelijke kweek hebben van deze nematode een aantrekkelijk experimenteel instrument gemaakt. In de bodem voeden de wormen zich met bacteriën en rottend organisch materiaal (bron van sterolen). In het laboratorium kunnen grote populaties gekweekt worden onder eenvoudige en goedkope condities, namelijk op agarplaten in de aanwezigheid van *E. coli* cellen (Sulston en Hodgkin, 1988). *C. elegans* is een hermafrodiet en reproduceert voornamelijk via zelfbevruchting. Bijgevolg bestaan populaties van deze nematode in wezen uit homozygote organismen. De wormen zijn echter ook in staat tot kruisbevruchting. Mannetjes zijn zeldzaam en ontstaan spontaan in een populatie door X-chromosoom nondisjunctie met een frequentie van slechts 0.1% (Hodgkin *et al.*, 1979). De twee geslachten kunnen zowel op basis van uiterlijk als van gedrag van elkaar onderscheiden worden (Fig. 4.1).

4.1.2 Morfologie

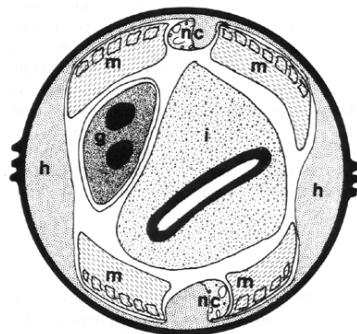
C. elegans heeft het typische eenvoudige bouwplan van nematoden en bestaat in essentie uit twee concentrische cilinders die van elkaar gescheiden zijn door een met vocht gevulde ruimte, de pseudocoel (Fig. 4.2) (Wood, 1988). De buitenste cilinder bevat de cuticula, de hypodermis, de spieren en de neuronen; de pseudocoel omvat de darm en de gonaden. De cuticula bestaat hoofdzakelijk uit collageen en wordt gesecreteerd door de onderliggende hypodermis. De vorm van de worm wordt in stand gehouden door interne hydrostatische druk (Crofton, 1966). De typische sinusoidale beweging van het dier wordt veroorzaakt door de organisatie van de spieren van de lichaamswand in vier longitudinale banden die vastgehecht zijn aan de cuticula.

Ook het spijsverteringssysteem is zeer eenvoudig. Het voedsel wordt opgenomen via de mond die uitkomt in de pharynx (zie verder). De darm ligt in het verlengde hiervan en mondt uit in het rectum en de anus (Fig. 4.1).



Figuur 4.1: Microscopische opname van *C. elegans* met aanduiding van de belangrijkste organen. Hermafrodit: boven, mannetje: onder.

Het reproductieve systeem van de hermafrodit bestaat uit twee U-vormige armen (voorwaarts en achterwaarts georiënteerd), die elk opgebouwd zijn, van distaal naar proximaal, uit een ovarium, een oviduct, een spermatheca en de uterus. De uterus staat in contact met de buitenwereld via de vulva en bevat bevruchte eitjes en embryo's in de eerste stadia van ontwikkeling. De mannelijke gonaden bestaan uit slechts één arm die via het vas deferens verbonden is met de cloaca. De staart is waaivormig en bevat neuronen, spieren en hypodermale structuren die gespecialiseerd zijn voor de paring (Fig. 4.1).



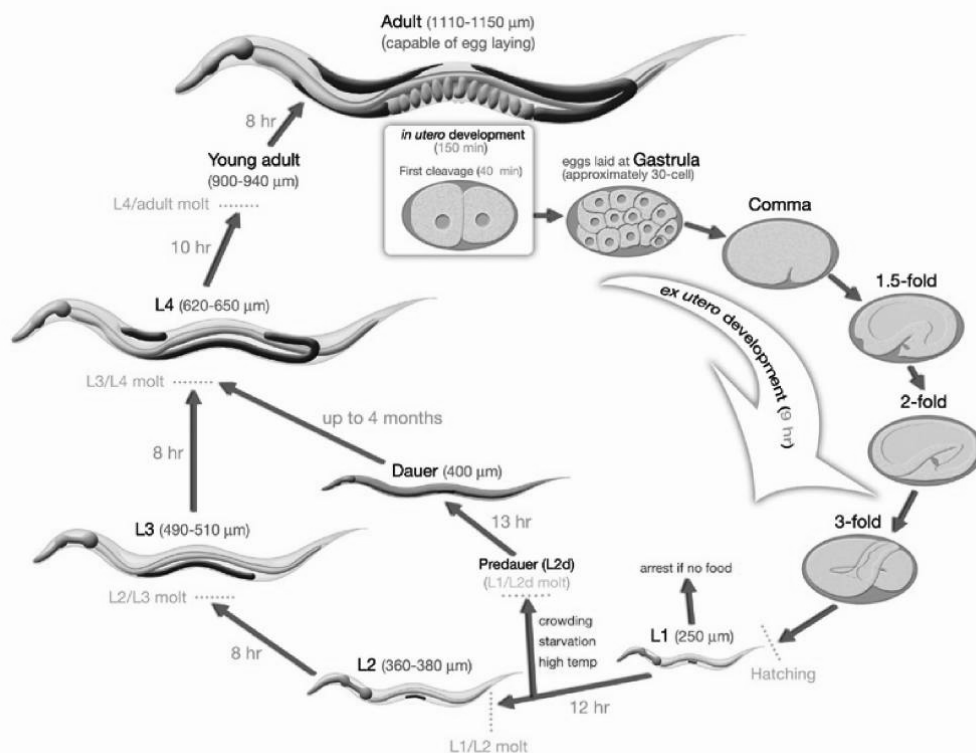
Figuur 4.2: Dwarse doorsnede door *C. elegans*. g: gonade, h: hypodermale kam, i: darm, m: spier, nc: zenuwstreng.

C. elegans detecteert signalen uit zijn omgeving via gecilieerde sensorische cellen die ingebed liggen in poriën in de cuticula. De belangrijkste gevoelsorganen zijn de twee amfiden in de kopregio. Deze zijn opgebouwd uit verschillende types van sensorische

neuronen die respectievelijk verantwoordelijk zijn voor de detectie van wateroplosbare componenten (Bargmann *et al.*, 1990), vluchtige componenten (Bargman *et al.*, 1993) en temperatuurfluctuaties (Mori en Ohshima, 1995). De fasmiden zijn kleinere, maar gelijkaardige orgaanjes aanwezig in de staartregio.

4.1.3 Levenscyclus

Na het uitsluipen uit het ei ontwikkelen de wormen tot vruchtbare adulten via vier larvale stadia (L1-L4) die van elkaar gescheiden zijn door een vervelling (Fig. 4.3). Tijdens elke vervelling wordt een nieuwe cuticula gesecreteerd door de onderliggende hypodermis en wordt de oude cuticula afgeworpen. De ontwikkeling is gewoonlijk afgerond in twee dagen en wordt gevolgd door een reproductieve fase van ongeveer vier dagen. Postreproductieve adulten kunnen nog twee à drie weken overleven. Het aantal nakomelingen dat een adulte hermafrodiet kan produceren is gelimiteerd door de beschikbare hoeveelheid zaadcellen. In het laboratorium kunnen ongeveer 300 nakomelingen per adult verwacht worden (Klass, 1977). Na paring met mannetjes kunnen ze echter tot meer dan 1000 nakomelingen produceren.



Figuur 4.3: De levenscyclus van *C. elegans*.

Onder ongunstige omgevingscondities (hoge populatiedensiteit, hoge temperatuur of limiterende hoeveelheden voedsel) wordt de ontwikkeling stopgezet bij de tweede vervelling en wordt er een alternatief dauerstadium gevormd. Dauerlarven zijn gespecialiseerd voor verspreiding en lange-termijnoverleving (Cassada en Russell, 1975). Zij

voeden zich niet en kunnen minstens acht tot tien keer langer leven dan normaal (Klass en Hirsh, 1976). Tijdens het dauerstadium hebben de dieren een aangepast metabolisme. Zo stapelen ze bijvoorbeeld vet op in de darmcellen (Albert en Riddle, 1988) en hebben de enzymen van de Krebscyclus een verlaagde activiteit. De activiteit van het enzym fosfofructokinase vertoont echter een verhoogde activiteit, wat wijst op een verhoogde capaciteit om glycogeen te metaboliseren (Riddle en Albert, 1997). Dauers zijn ook stressresistenter, zoals geïllustreerd wordt door de verhoogde activiteit van de enzymen superoxidedismutase en catalase (Larsen, 1993; Vanfleteren en De Vreese, 1995). De beslissing om te ontwikkelen tot het alternatieve dauerstadium wordt reeds gemaakt tijdens het eerste larvale stadium als reactie op de detectie van een specifiek feromoon (Golden en Riddle, 1984). Het dauerferomoon wordt geëxcreteerd in zeer lage hoeveelheden. Recent werd de chemische structuur ervan opgehelderd (Jeong *et al.*, 2005). Daartoe werd enerzijds het natuurlijke feromoon gezuiverd en getest op de mogelijkheid om dauers te induceren. Anderzijds werd het feromoon ook synthetisch aangemaakt. Het gezuiverde extract en het synthetische feromoon (daumone) bleken even potent in het induceren van dauers. Toch zijn ze nog niet te vergelijken met het dauerferomoon in zijn natuurlijke vorm, aangezien beide in μM hoeveelheden moesten worden toegevoegd om dauerlarven te kunnen induceren. Het dauerferomoon wordt constitutief vrijgesteld door de nematoden en bijgevolg is de concentratie ervan een indicatie voor de densiteit van de populatie. Een hoge feromoon/voedsel ratio zal leiden tot de ontwikkeling van dauers, terwijl de omgekeerde conditie groei zal stimuleren. Bij intermediaire feromoonconcentraties zullen de temperatuur en het voedselaanbod de respons op het feromoon moduleren (Golden en Riddle, 1982; Golden en Riddle, 1984). Wanneer de omgevingscondities weer gunstig worden, zal de dauer zich opnieuw beginnen voeden en vervellen tot L4 en tenslotte tot adult.

4.1.4 Genetica

Het genoom van *C. elegans* bestaat uit ongeveer 100×10^6 baseparen, georganiseerd in zes chromosomen: vijf autosomen en één X-chromosoom. Hermafrodieten zijn diploïd voor de zes chromosomen (XX), terwijl mannetjes diploïd zijn voor de autosomen, maar slechts één X-chromosoom bezitten (XO). De genomische sequentie werd opgehelderd in 1998 (*C. elegans* sequencing consortium, 1998) en voorspelt meer dan 18 000 genen (Gershon en Gershon, 2002). Veel van deze genen zijn orthologen van genen in hogere organismen (Blaxter, 1998; Ruvkun en Hobert, 1998). Genetische analyse wordt vergemakkelijkt door het feit dat mannetjes met hermafrodieten kunnen paren, wat resulteert in culturen met 50% mannetjes, omdat de zaadcellen van de mannetjes bij voorkeur gebruikt worden. Dubbele mutanten kunnen zo makkelijk bekomen worden. Dieren die een recessieve mutatie dragen kunnen bovendien gemakkelijk homozygoot gemaakt worden. Mutaties kunnen eenvoudig geïnduceerd worden door alkyliserende agentia zoals ethylmethaansulfonaat (EMS) of door bestraling (Sulston en Hodgkin, 1988). Verder kunnen ook transgene wormen gemakkelijk bekomen worden door de injectie van DNA afkomstig uit eender welk organisme (Epstein en Shakes, 1995; Hope, 1999). Een ander voordeel van *C. elegans* is dat de expressie van bepaalde genen kan geïnhibeerd worden door RNA interferentie (RNAi). Injectie van

dubbelstrengig RNA (dsRNA) of voeding van de wormen met bacteriën die dubbelstrengig RNA produceren leidt tot de specifieke inhibitie van het gewenste gen (Timmons en Fire, 1998). Het RNAi proces bestaat uit een initiatiefase en een executiefase. Tijdens de initiatiefase wordt het dsRNA door Dicer (een RNase) verknipt tot fragmenten van 21–23 nucleotiden. Deze fragmenten worden *small interfering* RNAs (siRNA) genoemd. Ze worden tijdens de executiefase ontwonden, waarna de *antisense* strengen worden geïncorporeerd in grotere ribonucleïnecomplexen die interfereren met de genexpressie door de siRNAs te gebruiken als *template* voor de identificatie van de complementaire (endogene) mRNAs. Deze worden vervolgens verknipt en afgebroken, met een gereduceerde expressie van het gen tot gevolg (Geley en Müller, 2004).

4.2 Kenmerken van veroudering in *C. elegans*

Onder normale omstandigheden zal *C. elegans* zijn ontwikkeling voltooien in ongeveer twee à drie dagen. Zolang de ontwikkeling niet compleet is, komt het verouderingsproces niet op gang. Dit werd aangetoond door de duur van de larvale periode te verlengen door uithongering van L1 larven. Zowel totale als partiële verhongering leidde tot een ontwikkelingsstop die opgeheven werd door toediening van *E. coli* als voedselbron. Voor elke dag van volledige onthouding van voedsel verlengde de totale levensduur met één dag. De duur van de juveniele fase kon zo verlengd worden tot 11 dagen zonder een significante invloed te hebben op de resterende adulte levensduur. Dit suggereert dus dat het verouderingsproces pas start na de laatste larvale vervelling (Johnson *et al.*, 1984; Muylaert en Vanfleteren, 1999).

Veroudering in *C. elegans* wordt gekarakteriseerd door een verminderde activiteit en de toename van ongecoördineerde (i.p.v. sinusoidale) bewegingen. Oude wormen zullen na een tijdje niet meer spontaan bewegen en worden als dood beschouwd als ze niet meer reageren op aanraking. De frequentie van spontane beweging daalt lineair met toenemende leeftijd in wild type wormen en blijkt een goede predictor te zijn van de levensduur (Hosono *et al.*, 1980; Bolanowski *et al.*, 1981; Johnson, 1987; Huang *et al.*, 2004). Verschillende rapporten tonen aan dat de verminderde beweging het gevolg is van een toenemende achteruitgang van de spieren van de lichaamswand (Herndon *et al.*, 2002; Glenn *et al.*, 2004). De schade is zowel een gevolg van de desintegratie van de sarcomeren als van een verminderde cellulaire integriteit (verlies van cytoplasma) en reflecteert een algemene verzwakking van de spieren, ook sarcopenia genoemd (Herndon *et al.*, 2002; Glenn *et al.*, 2004). De achteruitgang van de spieren is echter niet beperkt tot de spieren van de lichaamswand. Ook de farynx vertoont morfologische tekenen van veroudering die gepaard gaan met een dalende pompfrequentie en dus een verminderde opname van voedsel (Kenyon *et al.*, 1993; Garigan *et al.*, 2002; Herndon *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Chow *et al.*, 2006). Ook de snelheid van pompen bleek gecorreleerd te zijn met de levensduur (Huang *et al.*, 2004). Enkel de neuronen bleken niet of nauwelijks aangetast in oude wormen (Garigan *et al.*, 2002; Herndon *et al.*, 2002).

Andere kenmerken van veroudering zijn de vorming van vacuolen in de darmcellen, de opstapeling van dooiereiwitten, de verdikking van de cuticula (Herndon *et al.*, 2002) en de accumulatie van geoxideerde proteïnen (Adachi *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1999) en autofluorescente lipofuscines (Klass, 1977; Hosokawa *et al.*, 1994; Braeckman *et al.*, 2002b; Gerstbrein *et al.*, 2005). Ook de specifieke activiteit van verschillende enzymen zoals isocitraat lyase (Reiss en Rothstein, 1975), fosfoglyceraat kinase (Gupta en Rothstein, 1976), enolase (Sharma *et al.*, 1976) en aldolase (Reznick en Gershon, 1977; Goren *et al.*, 1977), gaat achteruit met toenemende leeftijd (deze experimenten werden voornamelijk uitgevoerd met de nematode *Turbatrix acet*). Noch veranderingen in aminozuursequentie, noch secundaire modificaties bleken echter aan de basis te liggen van de gereduceerde enzymatische activiteit, wat later ook bevestigd werd door tweedimensionele gelelectroforese-experimenten (Johnson en McCaffrey, 1985; Vanfleteren en De Vreese, 1994). Een alternatieve verklaring is dat de enzymen van oude dieren thermodynamisch onstabiel zijn en een conformationele verandering ondergaan. Een verlaagde proteïne *turnover* in oude wormen zou kunnen leiden tot de accumulatie van deze eiwitten in functie van de leeftijd. Deze hypothese werd bevestigd door een *pulse chase* experiment in *T. acet* waarin aangetoond werd dat de halfwaardetijd van de radioactief gemerkte eiwitten inderdaad toeneemt met stijgende leeftijd. Als gevolg van de vertraagde eiwit *turnover* zal de levensduur van individuele proteïnen toenemen, waardoor zij meer kans hebben om conformationele veranderingen te ondergaan. In plaats van te worden vervangen door intacte moleculen, zullen deze veranderde eiwitten in toenemende mate accumuleren (Rothstein, 1980).

Het normale bacteriële dieet van *C. elegans* is zelf levensduurverkortend. Microscopische analyse toonde een opstapeling van bacteriën in de farynx en de darm van oude wormen (Garigan *et al.*, 2002). Dieren die gegroeid werden op dode of groei-geïnhibeerde bacteriën vertoonden een verlenging van de levensduur met 30-40% wat suggereert dat iets geassocieerd met bacteriële proliferatie schadelijk is voor de wormen (Gems en Riddle, 2000; Garigan *et al.*, 2002).

Tijdens het verouderingsproces vertonen de wormen ook een veranderd metabolisme. Het zuurstofverbruik en de warmteproductie, beide directe indicaties van de metabole activiteit, dalen met toenemende leeftijd. Ook indirecte metingen die een maat zijn voor de metabole toestand waarin de wormen zich bevinden, wijzen op een daling van het metabolisme. Zo is er een exponentiële daling van de beschikbare hoeveelheid ATP, de lichtproductiepotentiaal (LPP) en de XTT reductiecapaciteit. De LPP *assay* meet de lichtproductie tengevolge van de reactie van endogene superoxiden met gereduceerd lucigenine. Aangezien de productie van superoxiden sterk gekoppeld is met de consumptie van zuurstof, is deze *assay* een maat voor de totale (maar niet noodzakelijk werkelijke) metabole capaciteit. De XTT *assay* meet de activiteit van enzymen die XTT kunnen reduceren en geeft dus de redoxtoestand van de wormen weer (Braeckman *et al.*, 2002b).

Microarray analyse van verouderende wormen toonde aan dat slechts een klein aantal genen (164, ofwel minder dan 1% van het genoom) een veranderd expressiepatroon vertoont tijdens veroudering. De meest opmerkelijke verschillen waren een differentiële

expressie van verschillende insulinegenen, een toename in de transcriptie van transposonsequenties, wat zou kunnen leiden tot een toename in genomische instabiliteit, en een daling in de expressie van leden van de HSP16 en HSP70 familie. Deze daling veroorzaakt mogelijk een toename in foutief gevouwen eiwitten, met verhoogde stress en veroudering tot gevolg (Lund *et al.*, 2002). Een vroegere studie had ook al aangetoond dat slechts een klein aantal (12) genen een veranderd expressiepatroon heeft tijdens veroudering (Fabian en Johnson, 1995). Een recent *microarray* experiment waarin specifiek de expressie van stress-geassocieerde genen in individuele, verouderende nematoden onderzocht werd, bevestigde de daling in de expressie van HSP-16 familieleden (Golden en Melov, 2004). Het gebrek aan grootschalige veranderingen in expressiepatroon was niet helemaal onverwacht, aangezien ook tweedimensionele gelelectroforese-experimenten geen dramatische veranderingen in het translationele patroon van ongeveer 700 proteïnen van verouderende wormen kon vaststellen (Johnson en McCaffrey, 1985; Vanfleteren en De Vreese, 1994).

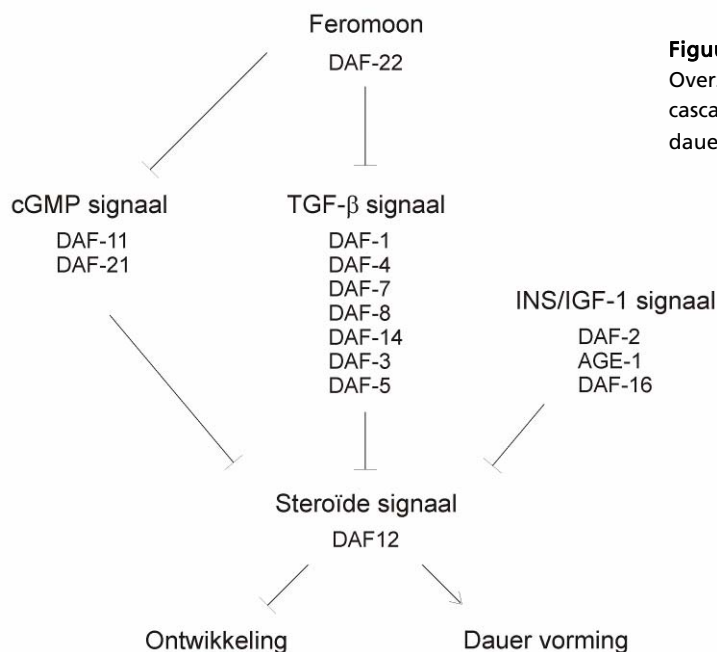
4.3 Regulatie van de levensduur in *C. elegans*

4.3.1 Endocriene signalisatie

4.3.1.1 Dauers

Meer dan 30 daf (*dauer formation abnormal*) genen werden geïdentificeerd die betrokken zijn bij de regulatie van het langlevende dauerstadium. Mutaties in deze genen resulteren ofwel in de onmogelijkheid om dauers te vormen (dauer-defectief of daf-d) ofwel in de vorming van dauers onder groei-bevorderende condities (dauer-constitutief of daf-c) (Riddle en Albert, 1997). Niet-conditionele daf-c mutanten vormen dauerlarven onafhankelijk van signalen uit de omgeving, terwijl temperatuursensitieve daf-c mutanten enkel dauers vormen bij de restrictieve temperatuur. Wanneer deze laatste getransfereerd worden naar de permissieve temperatuur, verlaten ze het dauerstadium en zetten hun ontwikkeling tot adult verder (Swanson en Riddle, 1981). Genetische en moleculaire analyse van de verschillende daf loci hebben meerdere neuroëndocriene *pathways* aan het licht gebracht die de ontwikkeling tot dauerlarven reguleren als respons op signalen uit de omgeving (Fig. 4.4) (Riddle *et al.*, 1981; Vowels en Thomas, 1992; Thomas *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1995; Riddle en Albert, 1997). De chemosensorische uiteinden van de amfide neuronen staan in contact met de externe omgeving en mediëren de sensorische signalen die nodig zijn voor de ontwikkeling van het dauerstadium (Albert *et al.*, 1981; Schackwitz *et al.*, 1996). *daf-11* en *daf-21* komen tot expressie in deze sensorische neuronen en staan in voor de vroege signalisatie via de secundaire boodschapper cGMP (Vowel en Thomas, 1992; Birnby *et al.*, 2000). Een tweede groep genen (*daf-1*, *daf-4*, *daf-7*, *daf-8*, *daf-14*, *daf-3* en *daf-5*) vormt de *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) *pathway* en werkt in parallel met *daf-11* en *daf-21*. Signalisatie via beide *pathways* is vereist om de ontwikkeling van dauers onder groei-bevorderende condities te inhiberen (Thomas *et al.*, 1993; Murakami *et al.*, 2001). Een derde

groep genen die instaat voor de regulatie van het dauerstadium (met o.a. *daf-2*, *age-1* en *daf-16*), vormt de *Insulin/Insulin Growth Factor-1 pathway*. Dit signaaltransductiepad is eveneens actief onder groei-bevorderende condities en reguleert naast het dauerstadium ook stressresistentie, fertiliteit en metabolisme (Tatar *et al.*, 2003). Signalen afkomstig van de insuline en TGF- β *pathways* convergeren ter hoogte van de nucleaire hormoonreceptor *daf-12* om de vorming van dauerlarven te reguleren (Antebi *et al.*, 2000). Deze signaaltransductiepaden worden op hun beurt beïnvloed door serotonergische en muscarine neurotransmitters. De snelle inductie van serotonine in aanwezigheid van voedsel stimuleert de productie van liganden voor de insuline en TGF- β *pathways* (Sze *et al.*, 2000). De muscarine receptor moduleert enkel de activiteit van de insuline *pathway*. Na binding van een acetylcholine ligand signaleert deze receptor het einde van het dauerstadium, waarna de ontwikkeling tot adult wordt verdergezet (Tissenbaum *et al.*, 2000). Mutaties in elk van deze neuroëndocriene *pathways* kunnen de misplaatste vorming van dauers induceren, maar enkel mutaties in de insuline *pathway* veroorzaken een verlenging van de adulte levensduur (Klass, 1983; Friedman en Johnson, 1988; Kenyon *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1995). Het vervolg van paragraaf 4.3.1 is samengevat in figuur 4.6.



Figuur 4.4:

Overzicht van de verschillende signalisatiecascades die de ontwikkeling van het dauerstadium controleren.

4.3.1.2 Insuline signalisatie

Onder groei-bevorderende condities veroorzaakt de activering van de insuline-achtige receptor DAF-2 een intracellulaire signalisatiecascade die uiteindelijk resulteert in de fosforylering en inactivering van de FOXO transcriptiefactor DAF-16, de belangrijkste modulator van de levensduur in *C. elegans*. De gensequentie van DAF-16 vertoont homologie met die van de leden van de *forkhead* familie van transcriptiefactoren. Deze eiwitfamilie wordt gekarakteriseerd door de aanwezigheid van een specifiek DNA-bindend

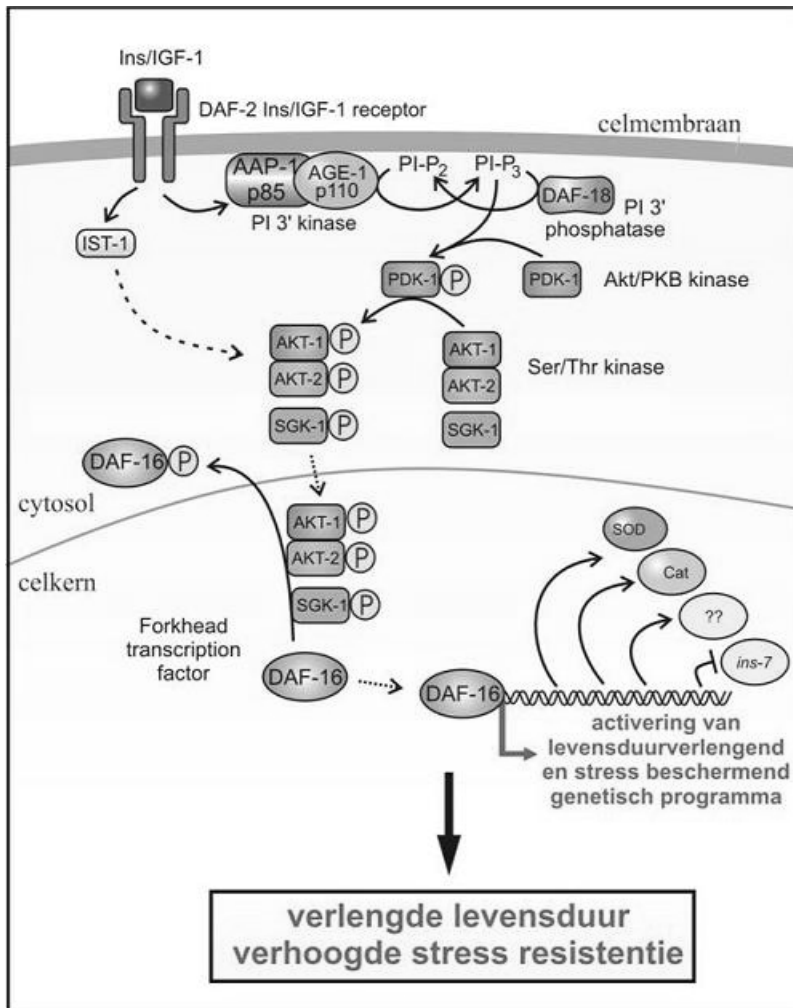
domein (Ogg *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997). Alternatieve *splicing* ter hoogte van de *daf-16* locus genereert 3 transcripten (a1, a2 en b) met verschillende biologische functies. Zo is de DAF-16a activiteit belangrijk voor de verlengde levensduur en de meeste aspecten van dauer vorming in *daf-2* mutanten. DAF-16b is enkel noodzakelijk voor het hermodelleren van de farynx bij de vorming van volledige dauers (Lin *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Studies met DAF-16::GFP fusies tonen aan dat DAF-16 tot expressie komt in de meeste celtypes. Onder standaard kweekcondities is het fusieproteïne cytoplasmatisch gelokaliseerd. Inhibitie van *daf-2* resulteert in de translocatie van DAF-16::GFP naar de nucleus en de vorming van dauers. DAF-2/insuline signalisatie heeft dus de export van DAF-16 uit de nucleus tot gevolg (Henderson en Johnson, 2001). Zeer recent werd een link aangetoond tussen de DAF-2/insuline *pathway* en de ubiquitine *pathway*. RLE-1 (E3 Ubiquitine Ligase) katalyseert de ubiquitinatie van DAF-16, wat leidt tot de afbraak van dit eiwit in het proteasoom (Li *et al.*, 2007).

Upstream van de insuline *pathway* bevinden zich *unc-64* en *unc-31*. *unc-64* is een syntaxine homoloog dat betrokken is bij de vorming van synaptische vesikels en *unc-31* codeert voor een homoloog van Ca^{2+} -afhankelijk Activator Proteïne voor Secretie (CAPS), een eiwit dat noodzakelijk is voor de Ca^{2+} -gestimuleerde peptideseecretie in een zoogdiercellijn (Ann *et al.*, 1997). Mutaties in deze genen veroorzaken een *daf-16*-afhankelijke verlenging van de levensduur en de constitutieve vorming van dauers (Aillon *et al.*, 1999). Beide genen komen tot expressie in de neuronen en spelen vermoedelijk een rol bij de secretie van een ligand voor de DAF-2 receptor (Aillon *et al.*, 1999; Muñoz en Riddle, 2003).

Niet minder dan 40 insuline-achtige genen worden voorspeld op basis van de genoomsequentie van *C. elegans* (Duret *et al.*, 1998; Pierce *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; www.wormbase.org). Door gebruik te maken van GFP constructen kon aangetoond worden dat de meeste *ins* genen een deels overlappend expressiepatroon vertonen in de neuronen (Pierce *et al.*, 2001). Slechts enkele insuline-achtige liganden werden in detail bestudeerd. Zo blijkt INS-1 een DAF-2 antagonist te zijn aangezien overexpressie van het eiwit leidt tot de vorming van dauers (Pierce *et al.*, 2001). *ins-18* RNAi resulteert in verlengde levensduur, wat suggereert dat het de levensduur reguleert door DAF-2 te activeren (Kawano *et al.*, 2000). DAF-28 is eveneens een DAF-2 agonist. Mutatie van het gen resulteert in verminderde insuline signalisatie en de vorming van dauers (Li *et al.*, 2003). Bij een *ins-11* mutant kon geen verlengde levensduur waargenomen worden, maar de mutatie kon wel de verlengde levensduur tengevolge van *ins-7* RNAi onderdrukken. Dit suggereert dat INS-11 een antagonistische functie heeft en andere, agonistische, peptiden zoals INS-7 kan verhinderen om op de DAF-2 receptor te binden (Kawano *et al.*, 2006).

daf-2 zelf codeert voor een insuline-achtige receptor die homologie vertoont met zowel de humane insulinereceptor als met de humane *insulin growth factor-I* (IGF-1) receptor. DAF-2 is de enige insulinereceptor in het *C. elegans* genoom en bestaat uit een signaalpeptide, een ligand-bindend domein, een vermoedelijke proteolytische site, een transmembranair domein en een intracellulair tyrosine-kinasedomein. De activering van DAF-2 na binding van een agonistisch ligand gebeurt vermoedelijk via autofosforylatie van geconserveerde tyrosineresiduen (Kimura *et al.*, 1997) en resulteert in de activering van een fosfatidylinositol-3-OH kinase (Fig. 4.5). Dit kinase bestaat uit een p55-achtige

regulatorische subunit (AAP-1) (Wolkow *et al.*, 2002) en een p110 katalytische subunit (AGE-1) (Morris *et al.*, 1996). AAP-1 zorgt voor de stabilisatie en activering van de katalytische subunit, terwijl AGE-1 het signaalmolecule PIP_3 (fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfaat) genereert. DAF-18, een humaan PTEN homolog met 3-fosfatase activiteit is een antagonist van dit kinase (Ogg en Ruvkun, 1998). Het beïnvloedt DAF-2 signalisatie door de regulatie van de beschikbare hoeveelheid PIP_3 (Solari *et al.*, 2005). De lipide secundaire boodschapper PIP_3 activeert het Akt/PKB kinase homolog PDK-1 (Paradis *et al.*, 1999) dat op zijn beurt AKT-1, AKT-2 (Paradis en Ruvkun, 1998) en SGK-1 activeert (Hertweck *et al.*, 2004). Deze kinasen vormen een trimeer complex dat vermoedelijk direct gefosforyleerd en bijgevolg geactiveerd wordt door PDK-1. AKT-1 en AKT-2 zijn redundant en zijn betrokken bij de regulatie van het dauerstadium. SGK-1 daarentegen speelt een rol bij de regulatie van de levensduur en stressresistentie. Elk kinase in dit complex bezit de mogelijkheid om DAF-16 direct te fosforyleren, wat resulteert in de inactivering van het eiwit en zijn translocatie van de nucleus naar het cytoplasma.



Figuur 4.5: Overzicht van de insuline/IGF-1 *pathway* in *C. elegans*.

Sterke mutaties die de activiteit van *daf-2* of genen die positief gereguleerd worden door *daf-2* verminderen, veroorzaken de constitutieve vorming van dauers. Zwakkere of temperatuursensitieve mutaties resulteren in adulten met een verlengde levensduur (100%

bij *daf-2* mutatie en 65% bij *age-1* mutatie). Deze fenotypes worden gesupprimeerd door mutaties in *daf-18* en *daf-16* (Kenyon *et al.*, 1993; Gottlieb en Ruvkun, 1994; Larsen *et al.*, 1995; Dorman *et al.*, 1995). Mutaties in *daf-12* wijzen op complexere interacties. Zij kunnen de verlengde levensduur van zwakke klasse-I *daf-2* allelen (gekenmerkt door de constitutieve vorming van dauers, een verlengde levensduur en een verhoogde thermotolerantie) gedeeltelijk onderdrukken, terwijl zij een synergistische verlenging van de levensduur vertonen in combinatie met sterke klasse-II *daf-2* allelen (gekenmerkt door de fenotypes van klasse-I en bijkomende pleiotrope eigenschappen zoals gedragsstoornissen en defecten in de larvale ontwikkeling) (Larsen *et al.*, 1995; Gems *et al.*, 1998). Dit suggereert een modulerende rol voor DAF-12 wanneer DAF-16 nucleair gelokaliseerd is tengevolge van gereduceerde insuline signalisatie (Rottiers en Antebi, 2006). De nucleaire hormoonreceptor DAF-12 bezit twee afzonderlijke activiteiten (A en B) die vermoedelijk gespecificeerd worden door de aan- of afwezigheid van een steroïdeligand (Antebi *et al.*, 2000; Ludewig *et al.*, 2004). In aanwezigheid van een DAF-12 ligand (DAF-2 *pathway* actief, DAF-16 cytoplasmatisch gelokaliseerd) resulteert DAF-12A activiteit in reproductieve groei en korte levensduur. In afwezigheid van dit ligand (DAF-2 *pathway* inactief, DAF-16 nucleair gelokaliseerd) vormt DAF-12B een corepressorcomplex met DIN-1 dat de expressie van genen voor reproductie inhibeert en resulteert in de vorming van dauers, opstapeling van vet en een verlengde levensduur (Ludewig *et al.*, 2004). DAF-9, een cytochroom P-450 dat tot expressie komt in de somatische gonaden, het zenuwstelsel en de hypodermis, integreert signalen afkomstig van de TGF- β en insuline *pathways* en produceert of modificeert een lipofiel ligand voor de DAF-12 receptor (Gerisch *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2002). Ook DAF-36, een Rieske oxygenase dat tot expressie komt in de darm, speelt een rol in het metabolisme van dit steroïdehormoon (Rottiers *et al.*, 2006).

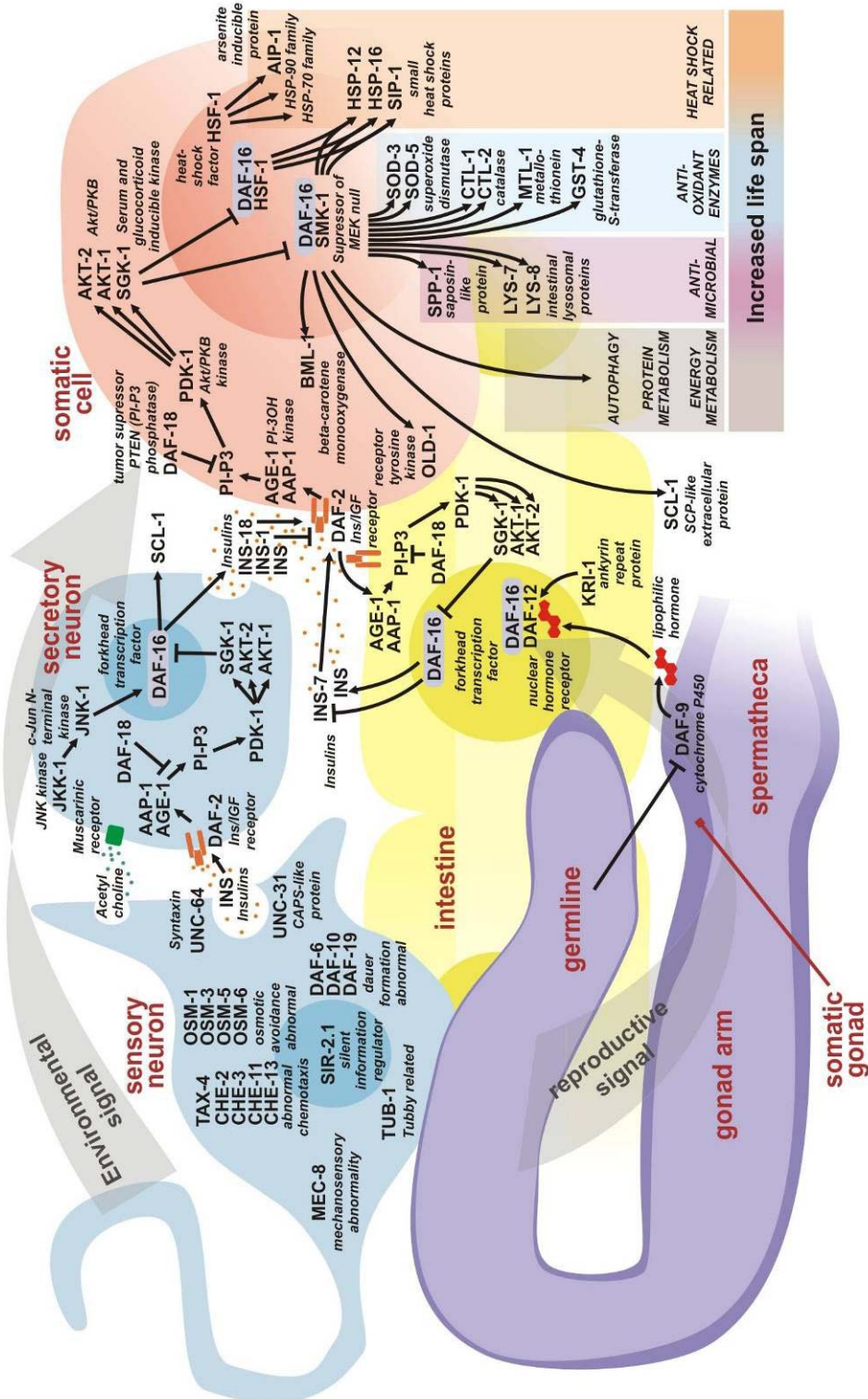
4.3.1.3 Timing van insuline signalisatie

Om na te gaan tijdens welk stadium insuline signalisatie vereist is in *C. elegans*, werden wild type wormen op verschillende leeftijden onderworpen aan *daf-2* RNAi. *daf-2* RNAi geïnitieerd tijdens het jong-adulte stadium veroorzaakte een verlengde levensduur vergelijkbaar met de levensduurverlenging die geobserveerd werd indien RNAi geïnitieerd werd kort na het uitsluipen uit het ei. Hieruit werd geconcludeerd dat *daf-2* enkel noodzakelijk is tijdens het adulte stadium voor de regulatie van de levensduur. Omdat zowel *daf-2* larven als dauers stressresistent zijn, moet *daf-2* stressresistentie reguleren tijdens de larvale stadia. Wormen die als adult behandeld werden met *daf-2* RNAi bleken echter ook resistent te zijn tegen paraquat. Dus, *daf-2* kan ook in adulte wormen stressresistentie reguleren. Verder werd aangetoond dat *daf-2* reproductie en levensduur onafhankelijk van elkaar controleert. Zo werd vastgesteld dat *daf-2* RNAi geïnitieerd voor het laatste larvale stadium (L4) de reproductie kon vertragen (wat karakteristiek is voor het fenotype van *daf-2* mutanten) (Dillin *et al.*, 2002a). Voor de regulatie van het dauerstadium is *daf-2* signalisatie dan weer vereist tijdens de eerste twee larvale stadia (Golden en Riddle, 1984). Zeer recent werd aangetoond dat *akt-1* en *pdk-1* ook een rol spelen tijdens de ontwikkeling, aangezien activerende mutaties in beide genen het Daf-c fenotype van een *age-1* mutant konden onderdrukken. De verlengde levensduur en stressresistentie van *age-1*

konden echter door de activerende mutaties niet opgeheven worden. Dit wijst op een rol voor *akt-1* en *pdk-1* tijdens de larvale stadia (Gami *et al.*, 2006).

4.3.1.4 Weefsel specifieke insuline signalisatie

Door gebruik te maken van *daf-2* genetische mozaïeken werd onderzocht welke cellen DAF-2 activiteit nodig hebben om te ontwikkelen tot adulten met een normale levensduur (Apfeld en Kenyon, 1998). De mozaïeken werden geconstrueerd door het inbrengen van een chromosomale duplicatie met daarop het *daf-2* gen in een *daf-2(-)* genetische achtergrond. Omdat dit niet-geïntegreerde chromosomale fragment tijdens de celdeling niet altijd mee dupliceert, zullen sommige cellen *daf-2(-)* zijn, terwijl andere *daf-2(+)* blijven. Aangezien de volledige afstamming van de cellen gekend is, kunnen beide celtypes van elkaar onderscheiden worden door de aanwezigheid van gekoppelde merker genen. Deze genetische mozaïeken laten toe om na te gaan of een genproduct op een al dan niet cel-autonome manier functioneert (fenotype en genotype komen met elkaar overeen bij cel-autonomie). Er werd aangetoond dat zowel dauer stadium, reproductie als levensduur op een niet cel-autonome manier gereguleerd worden. Dit suggereert dat DAF-2 signalisatie in één celtype resulteert in de vorming van een secundair signaal dat op zijn beurt de levensduur van andere celtypes beïnvloedt (Apfeld en Kenyon, 1998). Dit onderzoek kon echter niet aantonen in welke weefsels DAF-2 activiteit specifiek vereist is voor de regulatie van de levensduur. Wolkow en collega's (2000, 2007) brachten daarom *daf-2* of *age-1* tot expressie in welbepaalde cellen van een langlevende *daf-2* of *age-1* mutant door gebruik te maken van weefsel specifieke promotoren. In tegenstelling tot de expressie van *daf-2* of *age-1* in de spieren en de darm, was neuronale expressie in de respectievelijke mutantenvoldoende om de verlengde levensduur volledig te onderdrukken (Wolkow *et al.*, 2000). Zeer recent toonde deze onderzoeksgroep ook aan dat insuline signalisatie in een gedeelte van de neuronen voldoende is om de vorming van dauers tegen te gaan en een wild type levensduur te promoten (Iser *et al.*, 2007). Gelijkaardige experimenten met *daf-16* toonden aan dat de activiteit van DAF-16 in de darm vereist is voor de verlengde levensduur van *daf-2* mutantenvan. Expressie van *daf-16* in de neuronen van *daf-2;daf-16* mutantenvorderde daarentegen de vorming van dauers (Libina *et al.*, 2003). Dit suggereert dat DAF-2 en DAF-16 niet noodzakelijk in dezelfde celtypes actief zijn. Ook DAF-18 blijkt het dauer stadium en de levensduur zowel cel- als niet cel-autonoom te kunnen beïnvloeden en dit eveneens via de regulatie van DAF-16 (Masse *et al.*, 2005). Deze niet cel-autonome regulatie van DAF-16 zou kunnen bewerkstelligd worden via *feedback* regulatie door insuline-achtige liganden (Gami en Wolkow, 2006). Van ten minste één insuline-achtig ligand, *ins-7*, werd aangetoond dat de expressie gereguleerd wordt door DAF-2/insuline signalisatie (Murphy *et al.*, 2003). Het is ook mogelijk dat DAF-2 signalisatie DAF-16 activiteit reguleert via Akt fosforylatie in dezelfde cellen en via een diffundeerbaar signaal in veraf gelegen cellen (Iser *et al.*, 2007).



Figuur 4.6: Genetische interacties die de levensduur van *C. elegans* beïnvloeden via de activering of inactivering van DAF-16 (Braeckman en Vanfleteren, 2007).

4.3.1.5 Andere *pathways* die DAF-16 reguleren

4.3.1.5.1 *Sensorische perceptie*

Zoals eerder vermeld zijn de amfiden de voornaamste sensorische organen van *C. elegans*. Elk amfide bestaat uit de gecilieerde uiteinden van twaalf sensorische neuronen met een 'sheet' cel en een 'socket' cel die een porie vormen naar de externe omgeving. Apfeld en Kenyon (1999) onderzochten elf mutanten (in 9 genen) met verschillende defecten in de structuur van de cilia (*che-2*, *che-3*, *che-11*, *che-13*, *osm-1*, *osm-5*, *osm-6*, *daf-10* en *daf-19*). Zij rapporteerden dat alle mutanten langlevend waren en dat deze levensduurverlenging gedeeltelijk kon gesupprimeerd worden door een mutatie in *daf-16* (Apfeld en Kenyon, 1999). Met behulp van laserablaties werd later aangetoond dat slechts enkele, specifieke sensorische neuronen belangrijk zijn voor de regulatie van de levensduur (Alcedo en Kenyon, 2004). Zowel gustatorische als olfactorische neuronen zijn hierbij betrokken, maar zij maken gebruik van verschillende *pathways*. Zo beïnvloeden de gustatorische neuronen de levensduur op een *daf-16*-afhankelijke manier. De activiteit van de olfactorische neuronen is echter slechts gedeeltelijk *daf-16*-afhankelijk (Alcedo en Kenyon, 2004).

4.3.1.5.2 *Germline signalisatie*

Door middel van laserablatie van de precursorcellen van de gonaden werd aangetoond dat de activiteit van DAF-16 ook onder de controle staat van het reproductieve systeem. Bij het uitsluipen uit het ei bestaan de gonaden van *C. elegans* uit vier precursorcellen, aangeduid als Z1 t.e.m. 4. Z1 en Z4 geven aanleiding tot de somatische gonaden, en Z2 en Z3 vormen de geslachtscellen. Studies waarbij de volledige gonade (Z1 t.e.m. Z4) werd weggebrand, konden geen effect op de levensduur aantonen, wat suggereert dat de productie van nakomelingen *per se* geen invloed heeft op het verouderingsproces (Kenyon *et al.*, 1993). Indien enkel de geslachtscelprecursoren vernietigd werden (Z2 en Z3), verlengde de levensduur echter met 60%. Deze levensduurverlenging bleek volledig afhankelijk te zijn van DAF-16, aangezien *germline* ablatie in een *daf-16* mutant geen effect had op de levensduur. Ook de activiteit van DAF-12 bleek hiervoor noodzakelijk. Later werd aangetoond dat de prolifererende geslachtscellen verantwoordelijk zijn voor de productie van een signaal dat de levensduur beïnvloedt (Arantes-Oliveira *et al.*, 2002). Dus, onder normale omstandigheden zorgen signalen afkomstig van de *germline* voor de inhibitie van DAF-16, wat resulteert in een verkorting van de levensduur. Anderzijds werd ook aangetoond dat de somatische gonaden een levensduurverlengend signaal produceren, vermoedelijk door inhibitie van DAF-2 (Hsin en Kenyon, 1999).

Het wegbranden van de precursoren van de geslachtscellen heeft een verhoogde nucleaire lokalisatie van DAF-16 in de darmcellen van volwassen wormen tot gevolg, wat communicatie tussen beide organen suggereert (Lin *et al.*, 2001). Deze communicatie verloopt via een lipofiel hormoon en vereist de activiteit van DAF-9, DAF-36 en DAF-12. De activiteit van deze genen is noodzakelijk voor de levensduurverlenging in *germline*-deficiënte wormen (Hsin en Kenyon, 1999; Gerisch *et al.*, 2001; Berman en Kenyon, 2006;

Rottiers *et al.*, 2006). *kri-1* werd in een RNAi *screen* geïdentificeerd als een supressor van de lange levensduur van *germline*-deficiënte wormen (Berman en Kenyon, 2006). De activiteit van KRI-1, een ankyrine *repeat* proteïne dat geëxprimeerd wordt in de darm en de farynx, bleek eveneens noodzakelijk voor de nucleaire lokalisatie van DAF-16 in wormen zonder *germline*. Een eenvoudig model is dan dat in *germline*-deficiënte dieren DAF-9 een lipofiel hormoon produceert in de gonaden. Dit hormoon migreert vervolgens naar de darm waar het bindt op DAF-12 en, in associatie met KRI-1, de nucleaire lokalisatie van DAF-16 in de darmcellen bevordert (Berman en Kenyon, 2006). Een mogelijke kandidaat voor het lipofiel hormoon is pregnenolone (PREG). Zeer recent werd aangetoond dat de concentratie van dit steroïde sterk verhoogd is in *germline*-deficiënte dieren. De productie van het hormoon was afhankelijk van de aanwezigheid van DAF-9. Bovendien kon de toediening van PREG de levensduur van *germline*-deficiënte *daf-9* mutanten aanzienlijk verlengen (Broué *et al.*, 2007). *kri-1*, *daf-9* en *daf-12* zijn niet nodig voor de functie of lokalisatie van DAF-16 in *daf-2* mutanten. Bijgevolg zijn de levensduurverlengende effecten van deze genen beperkt tot de reproductieve *pathway* (Berman en Kenyon, 2006).

4.3.1.5.3 JNK signalisatie

De *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK) werden geïdentificeerd als belangrijke cellulaire regulatoren die optimale reactie op veranderende fysische en chemische omgevingscondities mogelijk maken. Eén van deze MAPK signalisatiecascades in zoogdieren, de c-Jun NH₂-terminale kinasen (JNK), is ook bekend als de stress-geactiveerde MAP kinase *pathway* (Davis, 2000). Verschillende orthologen van deze JNK *pathway* componenten werden gekarakteriseerd in *C. elegans*. Overexpressie van *jnk-1* (JNK kinase) veroorzaakte een verhoogde stressresistentie en een toename van de levensduur met 40% en deze levensduurverlenging werd volledig onderdrukt door *daf-16* RNAi. Aangezien de overexpressie van dit gen een verdere toename van de levensduur van *daf-2* en *akt-1/akt-2* mutanten veroorzaakte, werd geconcludeerd dat JNK signalisatie in wormen de activiteit van DAF-16 moduleert in parallel met de insuline *pathway* (Oh *et al.*, 2005). Verder werd ook aangetoond dat JNK-1 DAF-16 rechtstreeks activeert door fosforylatie, waarna DAF-16 migreert naar de nucleaus. Deze fosforylatie plaatsen bevinden zich in de N-terminale regio van DAF-16 en zijn verschillend van deze van het Akt complex. Door gebruik te maken van *daf-16::gfp* constructen kon tenslotte aangetoond worden dat de JNK *pathway* de activiteit van DAF-16 reguleert als repons op stress (Oh *et al.*, 2005).

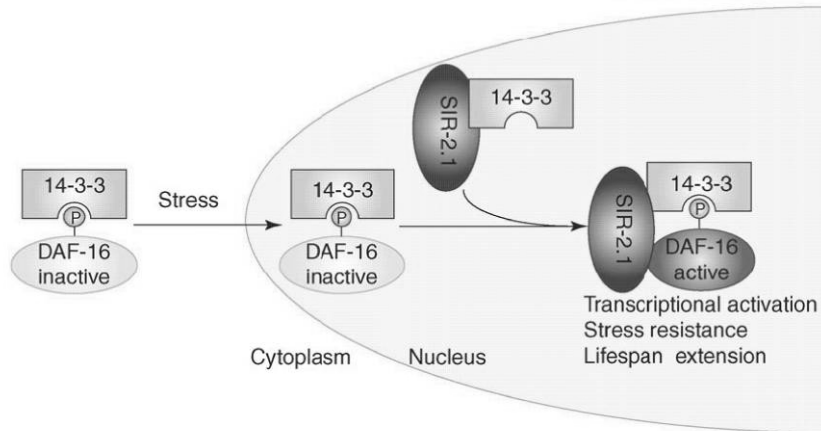
4.3.1.5.4 Regulatie door *tubby*

Eén van de weinige mutaties die in zoogdieren aanleiding geven tot zwaarlijvigheid komen voor in het *tubby* gen. Mutaties in *tubby* veroorzaken o.a. zwaarlijvigheid bij volwassen dieren, insuline resistentie en onvruchtbaarheid (Carroll *et al.*, 2004). In *C. elegans* resulteert deletie van het *tubby* gen, *tub-1*, in defecte chemotaxis en de accumulatie van triglyceriden, de voornaamste vorm van vetopslag in de worm (Ashrafi *et al.*, 2003). Naast een rol in het vetmetabolisme werd recent ook een rol voor *tub-1* in de regulatie van de levensduur

aangetoond. *tub-1* mutanten leven 20% langer dan wild type wormen en dit fenotype kon volledig gesupprimeerd worden door een mutatie in *daf-16*. De accumulatie van triglyceriden bleef in de dubbelmutanten echter onveranderd, wat wijst op een ontkoppeling van levensduur en vetmetabolisme in deze mutant. Dus, de verlengde levensduur is geen gevolg van een verhoogde vetopstapeling. *tub-1* wordt geëxprimeerd in verschillende sensorische neuronen (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

4.3.1.5.5 Regulatie door SIR2

SIR2 en zijn orthologen behoren tot de familie van NAD⁺-afhankelijke histon deacetylasen die reageren op metabole veranderingen, zoals de beschikbaarheid van nutriënten, en cellulaire stress (Hekimi en Guarente, 2003). Overexpressie van *sir-2.1* in *C. elegans* leidt tot een DAF-16-afhankelijke verlenging van de levensduur met 50% (Tissenbaum en Guarente, 2001). Zeer recent toonden twee onderzoeksgroepen gelijktijdig aan dat SIR-2.1 en DAF-16 fysisch met elkaar interageren voor de regulatie van levensduur en stressresistentie (Berdichevsky *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). SIR-2.1 bleek bovendien in staat om DAF-16-afhankelijke transcriptie te activeren, aangezien overexpressie van *sir-2.1* resulteerde in de inductie van het DAF-16 *target* gen *sod-3* (Berdichevsky *et al.*, 2006). Twee bijkomende eiwitten, de 14-3-3 proteïnen PAR-5 en FTT-2, werden geïdentificeerd die noodzakelijk zijn voor de verlengde levensduur en stressresistentie in een *sir-2.1* overexpressor stam (Berdichevsky *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Deze eiwitten kunnen zowel een complex vormen met SIR-2.1 als met DAF-16 en spelen een rol in de lokalisatie van DAF-16. Volgens model voor de rol van SIR-2.1 in de activering van DAF-16 werd gesuggereerd door Berdichevsky en collega's (2006). Onder normale omstandigheden verblijft DAF-16 in het cytosol. Het is dan inactief en wordt gebonden door 14-3-3 proteïnen. Verminderde insuline signalisatie veroorzaakt de defosforylatie van DAF-16 door het Akt complex wat leidt tot een dissociatie van de 14-3-3 eiwitten en de translocatie van DAF-16 naar de nucleus. Daar zal DAF-16 de transcriptie van levensduurverlengende genen activeren op een SIR-2.1-onafhankelijke manier. Onder condities van stress (Fig. 4.7) zal DAF-16 ook verhuizen naar de nucleus, maar dan vermoedelijk tengevolge van JNK signalisatie (Oh *et al.*, 2005). SIR-2.1, zelf gelokaliseerd in de nucleus en gebonden door 14-3-3 eiwitten, zal met dit nucleair DAF-16 kunnen interageren en de transcriptie reguleren van genen betrokken bij stressresistentie (Berdichevsky *et al.*, 2006). De activering van DAF-16 door SIR-2.1 gebeurt waarschijnlijk via een *pathway* die parallel verloopt aan de insuline *pathway*, aangezien overexpressie van *sir-2.1* de lange levensduur van een *daf-2* mutant niet verder kon verlengen (Tissenbaum en Guarente, 2001). Ook had een *sir-2.1* mutatie geen invloed op de lange levensduur van *daf-2* mutanten (Wang en Tissenbaum, 2006). Tenslotte bleken de 14-3-3 eiwitten niet noodzakelijk voor de inductie van *sod-3* expressie in *daf-2(-)* dieren, maar wel in *sir-2.1* overexpresserende dieren (Berdichevsky *et al.*, 2006).



Figuur 4.7: Schematisch overzicht van de regulatie van DAF-16 door SIR-2.1 onder condities van stress (Chen en Guarente, 2007).

4.3.1.6 Coregulatoren van DAF-16

Aangezien de nucleaire localisatie van DAF-16 op zich niet voldoende is voor een levensduurverlenging onder condities van verlaagde insuline signalisatie (Lin *et al.*, 2001), werd op zoek gegaan naar moleculen die samenwerken met DAF-16 bij de regulatie van de levensduur. Zo werd recent aangetoond dat SMK-1 essentieel is voor de transcriptionele activiteit van DAF-16 (Wolff *et al.*, 2006). SMK-1 komt tot expressie in de kernen van de darmcellen, de hypodermale cellen en in verschillende neuronen en colocaliseert dus met DAF-16 (Libina *et al.*, 2003). *smk-1* RNAi in een *daf-2* mutant had een grotere gevoeligheid aan oxidatieve en UV stress tot gevolg. Ook de resistentie tegen pathogene bacteriën verminderde. Het eiwit is dus noodzakelijk voor de functie van DAF-16 in het immuun systeem en voor zijn beschermende rol bij oxidatieve en UV stress. SMK-1 bleek echter niet betrokken te zijn bij de respons op thermale stress. Ook de regulatie van het dauerstadium en de timing van reproductie zijn onafhankelijk van SMK-1 (Wolff *et al.*, 2006). Dit is in overeenstemming met eerdere resultaten die aantonen dat HSF-1 noodzakelijk is voor de DAF-16-gemedieerde reactie op warmtestress (Hsu *et al.*, 2003). *hsf-1* RNAi in wild type wormen veroorzaakt een versnelde veroudering (Garigan *et al.*, 2002) en onderdrukt de verlengde levensduur van *daf-2* en *age-1* mutanten (Hsu *et al.*, 2003; Morley en Morimoto, 2004). Overexpressie van *hsf-1* kon de levensduur met 40% verlengen en dit effect was DAF-16 afhankelijk. Beide eiwitten bleken echter ook onafhankelijk van elkaar hun activiteit te kunnen uitoefenen, wat suggereert dat zij de levensduur beïnvloeden door een zeer specifieke set van genen te reguleren. Een aantal shsp's (*small heat shock proteins*) bleek inderdaad bindingsplaatsen voor zowel DAF-16 als HSF-1 te bezitten en RT-PCR experimenten toonden aan dat de activiteit van beide genen vereist is voor de inductie van shsp expressie na een *heat shock* (Hsu *et al.*, 2003). Eerder werd reeds aangetoond dat overexpressie van deze en andere *heat shock* induceerbare genen de levensduur kunnen verlengen in *D. melanogaster* en *C. elegans* (Yokoyama *et al.*, 2002; Tatar *et al.*, 2003; Walker en Lithgow, 2003). Tenslotte is HSF-1 ook betrokken bij de vorming van dauers (Morley en Morimoto, 2004) en de werking van het immuun systeem (Singh en Aballay, 2006).

4.3.1.7 *Downstream* genen van DAF-16

Verschillende onderzoeksgroepen hebben zich de afgelopen jaren toegespitst op het vinden van genen die gereguleerd worden door de transcriptiefactor DAF-16 (voor een overzicht, zie: Murphy, 2006; Braeckman en Vanfleteren, 2007). In een eerste benadering werd een klein aantal specifieke kandidaat-genen onderzocht op basis van hun mogelijke betrokkenheid bij processen die gereguleerd worden door DAF-16. Zo werd de verhoogde stressresistentie van insuline *pathway* mutanten vaak gebruikt als uitgangspunt voor de analyse van een bepaald gen. Hoewel eerder al gesuggereerd werd dat de verhoogde activiteit van antioxidatieve enzymen direct of indirect zou kunnen gereguleerd worden door *age-1* (Larsen, 1993; Vanfleteren, 1993), werd pas in 1999 via Northern blot en RT-PCR aangetoond dat *sod-3* (dat codeert voor een MnSOD) specifiek onder de controle staat van DAF-16 (Honda en Honda, 1999). Later werd door middel van een SOD-3::GFP construct aangetoond dat de GFP-fluorescentie sterk geïnduceerd werd in afwezigheid van *daf-2* activiteit. Deze inductie was echter afwezig in een *daf-16(-)* achtergrond (Henderson *et al.*, 2006). Een verhoogde resistentie tegen Cd en Cu ionen in *daf-2* en *age-1* mutanten leidde tot de vaststelling dat *mtl-1* (metallothioneïne) sterk geïnduceerd wordt in deze mutanten tengevolge van blootstelling aan Cd. De aanwezigheid van een insuline respons sequentie in de promotor regio van dit gen suggereert een directe regulatie door DAF-16 (Barsyte *et al.*, 2001). Ook *hsp-16* (*heat shock protein*) werd geïdentificeerd als een gen dat onder directe controle staat van DAF-16 (Walker *et al.*, 2001; Walker en Lithgow, 2003).

Een gen dat bij toeval ontdekt werd voor zijn positieve invloed op levensduur en stressresistentie is *old-1* (Murakami en Johnson, 1998). *Old-1* codeert voor een transmembranair tyrosine kinase dat noodzakelijk is voor de verlengde levensduur van *age-1* en *daf-2* mutanten. Via RT-PCR en analyse van OLD-1::GFP transgenen kon aangetoond worden dat de expressie van dit gen afhankelijk is van DAF-16 (Murakami en Johnson, 2001).

RNAi inactivering van verschillende autofagie genen (o.a. *bec-1* en *atg-12*) leidde tot een suppressie van de lange levensduur van *daf-2* mutanten. Ook waren de *daf-2* wormen niet meer in staat om normale dauers te vormen (Melendez *et al.*, 2003; Hars *et al.*, 2007). Of deze autofagie genen ook effectief DAF-16-afhankelijk zijn is tot op heden nog onduidelijk. Een meer grootschalige benadering die leidde tot de identificatie van nieuwe *target* genen van DAF-16, was *differential display* PCR. Een reeks van 9 *dao* (*Dauer or Aging adult Overexpression*) genen bleek differentieel geëxprimeerd te zijn tussen *daf-2* mutanten en wild type wormen. Er werd zowel positieve als negatieve regulatie van de *dao* genen door DAF-2 waargenomen en de expressie van enkele van deze genen bleek ook afhankelijk te zijn van DAF-16 (Yu en Larsen, 2001). *dao-3* werd ook in een latere studie teruggevonden (Murphy *et al.*, 2003).

De beschikbaarheid van de volledige genoomsequentie van *C. elegans* (*C. elegans* Genome Sequence Consortium, 1998), vergemakkelijkte de toepassing van meer gesofisticeerde genomische methoden. Een belangrijke stap was de identificatie van de consensus sequentie voor de binding van DAF-16 en de muis homologen AFX, FKHR en FKHL1. Deze vier proteïnen binden eenzelfde sequentie op het DNA die aangeduidt wordt met DBE (*Daf-16 family protein-Binding Element*) (Furuyama *et al.*, 2000). Lee en collega's (2003) maakten

gebruik van deze kennis om DAF-16 *targets* op te sporen door middel van bioinformatica. Zij zochten naar DBE's in orthologe genen van *C. elegans* en *Drosophila* en vonden zes genen die onder de controle staan van DAF-16. Hiervan werden vier genen op een *daf-16*-afhankelijke manier onderdrukt in de *daf-2* mutant. De twee andere genen werden geïnduceerd. Aangezien alle zes genen de DBE sequentie bezitten en dus vermoedelijk direct door DAF-16 gereguleerd worden, suggereren deze resultaten dat DAF-16 niet alleen een rol speelt als transcriptionele activator, maar ook als repressor. Ook Ookuma en collega's (2003) onderzochten genen op basis van de aanwezigheid van DBE's in de regulatorische regio. Zij identificeerden *scl-1* als een DAF-16-afhankelijk eiwit dat noodzakelijk is voor de verlengde levensduur van *daf-2* en *age-1* mutanten. RT-PCR analyse toonde bovendien aan dat *scl-1* mRNA geïnduceerd wordt in wild type wormen na blootstelling aan verschillende vormen van stress. *scl-1* codeert voor een proteïne dat homologie vertoont met de familie van cysteïne-rijke secretorische proteïnen (CRISP) van zoogdieren (Ookuma *et al.*, 2003).

Een totaal andere aanpak maakte gebruik van chromatine immunoprecipitatie (ChIP) voor de identificatie van genen die gereguleerd worden door DAF-16 (Oh *et al.*, 2006). Bij ChIP worden eiwitten tesamen met *crosslinked* DNA geprecipiteerd, waardoor sequenties kunnen geïdentificeerd worden die rechtstreeks gebonden zitten op een transcriptiefactor. Het voordeel van deze techniek is dat *in vivo* targets van DAF-16 kunnen geïdentificeerd worden. Bijna 70% van de geïsoleerde genen bleek een DBE te bezitten. RNAi van enkele van deze genen resulteerde in een effect op levensduur, vetopstapeling of de vorming van dauers.

Het gebruik van transcriptionele *profiling* zoals SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) en *microarrays* resulteerde in een lange lijst van DAF-16-afhankelijke *targets* die kunnen onderverdeeld worden in genen betrokken bij stressresistentie, bescherming tegen bacteriële infecties en metabolisme. Tenslotte bleek ook een groot aantal genen met onbekende functie onder de controle van DAF-16 te staan (Murphy *et al.*, 2003; McElwee *et al.*, 2003; McElwee *et al.*, 2004; Golden en Melov, 2004; Halaschek-Wiener *et al.*, 2005). Hoewel de lijsten van DAF-16-afhankelijke genen uit de verschillende studies slechts een beperkte overlap vertonen, zijn de resultaten globaal gezien wel met elkaar in overeenstemming.

Naar analogie met eerdere resultaten werd in *daf-2* mutanten een DAF-16-afhankelijke inductie van genen vastgesteld die betrokken zijn bij de oxidatieve stressrespons. Naast de inductie van *sod-3*, vertoonden ook *sod-5*, de catalase genen *ctl-1* en *ctl-2*, en *gst-4* (glutathion-S-transferase) een verhoogd expressiepatroon. Ook *hsp-70*, verschillende kleine *heat shock* proteïnen (*hsp-12*, *hsp-16*) en *mtl-1* werden geïnduceerd (Murphy *et al.*, 2003; McElwee *et al.*, 2003; Halaschek-Wiener *et al.*, 2005). RNAi inactivering van een aantal van deze genen resulteerde in een 10-20% verkorting van de levensduur van *daf-2* mutanten wat suggereert dat elk van deze genen gedeeltelijk verantwoordelijk is voor de levensduurverlenging in deze mutanten (Murphy *et al.*, 2003).

Een andere groep DAF-16-afhankelijke genen die geïnduceerd werd in *daf-2* mutanten codeert voor antimicrobiële proteïnen. Verschillende lysosymes (*lys-7* en *lys-8*) en *spp-1*, een saposine-achtig eiwit met antibacteriële activiteit, werden geïdentificeerd die bijdragen aan de verlengde levensduur van deze mutanten (Murphy *et al.*, 2003). Ook een lid van de

thaumatine familie, allergene eiwitten met antifungale eigenschappen, vertoonde een hoger expressiepatroon in *daf-2* mutanten in vergelijking met N2 (Golden en Melov, 2004). Deze resultaten zijn in overeenstemming met eerdere vaststellingen over de opstapeling van bacteriën in de darm en de farynx van oude wormen die uiteindelijk zou kunnen leiden tot de dood van het organisme. *Daf-2* mutanten vertonen een verminderde opstapeling van bacteriën in vergelijking met wild type dieren en zijn ook resistenter tegen infecties (Garigan *et al.*, 2002; Garsin *et al.*, 2003).

Ook verschillende metabole genen werden geïdentificeerd die noodzakelijk zijn voor de verlengde levensduur van *daf-2* mutanten. Deze groep bevat genen betrokken bij het aminozuur metabolisme, de glyoxylaat cyclus (isocitraat lyase/malate synthase) en diverse proteasen (Murphy *et al.*, 2003). McElwee en collega's (2003) vonden echter geen systematische DAF-16-afhankelijke verschillen in de expressie van genen betrokken bij proteïne *turnover* en mitochondriale functie, hoewel de niet-proteasomale proteasen mogelijk wel bijdragen tot het Age fenotype. Ook verschillende metabole genen vertoonden eerder een verlaagd expressiepatroon in aanwezigheid van nucleair DAF-16. Gelijkaardige resultaten werden gepubliceerd door Halaschek-Wiener en collega's (2005).

Tenslotte werd vastgesteld dat genen die specifiek geïnduceerd worden tijdens het dauerstadium, ook een verhoogde expressie vertonen in *daf-2* mutanten (McElwee *et al.*, 2003; McElwee *et al.*, 2004). Dit is in overeenstemming met de eerder geformuleerde hypothese dat de verlengde levensduur van de insuline *pathway* mutanten een gevolg zou zijn van de expressie van dauer-specifieke levensduur-verlengende genen in adulte wormen (Kenyon *et al.*, 1993). Het gaat hierbij voornamelijk om kleine *heat shock* proteïnen, cytochroom P450, korte keten dehydrogenasen/reductasen, UDP-glucuronosyltransferasen en glutathion-S-transferasen. Deze klassen van eiwitten spelen in zoogdieren een rol bij de verwijdering van toxische endobiotische en xenobiotische stoffen wat suggereert dat een belangrijke oorzaak van de moleculaire schade die optreedt bij veroudering een gevolg is van een variëteit aan toxische (lipofiele) componenten (en dus niet enkel ROS). Ook verschillende metabole *pathways* (gluconeogenese, glyoxylaat *pathway* en trehalose biosynthese) blijken zowel in dauers als in *daf-2* adulten geïnduceerd te worden (McElwee *et al.*, 2006).

4.3.1.8 Metabolisme van insuline *pathway* mutanten

Volgens de *rate-of-living* en vrije-radicaaltheorie gaat een verlengde levensduur, zoals geobserveerd in de insuline *pathway* mutanten *daf-2* en *age-1*, gepaard met een daling van de metabole activiteit, een lage productie van ROS, een tragere accumulatie van moleculaire schade en een vertraagde snelheid van verouderen. Metabole studies geven echter een heel ander beeld. In een vroege studie werd waargenomen dat *age-1* mutanten een iets hogere zuurstofconsumptie hadden dan wild type wormen (Vanfleteren en De Vreese, 1996). Dit werd initieel ook waargenomen in een latere studie waarbij *daf-2* mutanten gebruikt werden, maar na correctie voor verschillen in grootte, was er geen onderscheid meer in zuurstofconsumptie tussen *daf-2* mutanten en wild type wormen (Braeckman *et al.*, 2002c). De *daf-2* mutanten produceerden iets minder warmte, wat resulteerde in een lagere calorimetrische/respirometrische (CR) ratio t.o.v. wild type dieren.

Dit wijst mogelijk op een sterkere koppeling van zuurstofconsumptie en ATP productie (wegens minder lekkage van protonen) en is in overeenstemming met de observatie van een hogere beschikbare hoeveelheid ATP in deze mutanten. De beschikbare hoeveelheid ATP blijft normaal redelijk constant en is het gevolg van een dynamisch evenwicht tussen productie en consumptie. De veranderde concentratie ATP in *daf-2* mutanten wijst dus op een verandering in de balans tussen ATP productie en consumptie (Braeckman *et al.*, 2002c; Houthoofd *et al.*, 2005b). Een andere studie toonde aan dat ook *daf-16* mutanten een lagere CR ratio hadden en een verlaagde productie van warmte. Het ATP niveau was echter normaal. Dit suggereert dat de hoge hoeveelheid ATP in *daf-2* mutanten eerder een gevolg is van een verlaagde ATP consumptie dan van een verhoogde ATP productie (Houthoofd *et al.*, 2005a). Tegen de theoretische voorspellingen in, bleken de mitochondriën van *daf-2* mutanten meer ROS (gemeten als H_2O_2) te produceren dan deze van wild type dieren. Het feit dat *daf-2* mutanten minder gecarboneerde proteïnen accumuleerden dan wild type wormen komt overeen met eerder vaststellingen dat deze mutanten een verhoogde antioxidant capaciteit hebben (Brys *et al.*, 2007). In tegenstelling tot wild type wormen daalde de XTT reductiecapaciteit niet met toenemende leeftijd in *daf-2* en *age-1* mutanten (Houthoofd *et al.*, 2005a; Houthoofd *et al.*, 2005b). Dus, de metabole activiteit van insuline *pathway* mutanten is eerder verhoogd dan verlaagd in vergelijking met wild type wormen. Bovenstaande resultaten zijn echter niet volledig vrij van controverse (Van Voorhies, 2002; Braeckman *et al.*, 2002d). Van Voorhies en Ward (1999) bepaalden de CO_2 output van *daf-2* en *age-1* mutanten en concludeerden dat de metabole snelheid lager ligt in deze wormen. Verschillende oorzaken liggen aan de basis van de afwijkende conclusies. Zo normaliseerden zij hun data t.o.v. het aantal wormen onder studie, zonder rekening te houden met verschillen in grootte en massa. Bovendien werden de wormen onder andere omstandigheden gekweekt en varieert de hoeveelheid geproduceerde CO_2 t.o.v. de hoeveelheid geconsumeerde zuurstof met het gebruikte substraat. Zo wordt er minder CO_2 per geconsumeerde zuurstof gevormd bij de verbranding van vet dan bij de verbranding van carbohydraten. Het feit dat *daf-2* en *age-1* mutanten meer vet opstapelen en gebruiken (Vanfleteren en De Vreese, 1995), zou dus een belangrijke factor kunnen zijn die het verschil in besluittrekking tussen beide onderzoeksgroepen, althans gedeeltelijk, kan verklaren (Braeckman *et al.*, 2002b; Houthoofd *et al.*, 2003b; Houthoofd *et al.*, 2005b). Ook in *D. melanogaster* werd geen lagere metabole snelheid gevonden in een insuline *pathway* mutant in vergelijking met wild type vliegen (Hulbert *et al.*, 2004).

4.3.2 Mitochondriale regulatie

De afgelopen jaren werden verscheidene mutaties geïdentificeerd die resulteren in defecten in de belangrijkste componenten van de mitochondriale elektronentransportketen (ETK). Deze mutanten worden collectief aangeduid met de term Mit mutanten. Paradoxaal genoeg blijken een aantal van deze mutanten een verlengde levensduur te hebben.

4.3.2.1 Langlevende Mit mutanten

clk-1 werd geïdentificeerd in een *screen* naar *maternal effect* mutaties in *C. elegans*. Mutaties in dit gen veroorzaken pleiotrope effecten waaronder een vertraagde ontwikkeling en een vertraging van het adulte gedrag zoals voortbeweging, faryngeale pompbeweging en defecatie. Daarnaast hebben *clk-1* mutanten ook een verlengde levensduur (Wong *et al.*, 1995; Lakowski en Hekimi, 1996). Het *clk-1* gen is sterk geconserveerd en is homoloog aan het *S. cerevisiae* *COQ7* gen dat noodzakelijk is voor de biosynthese van ubiquinone (Q) (Ewbank *et al.*, 1997). Later werd aangetoond dat *clk-1* in *C. elegans* codeert voor een mitochondriaal hydroxylase dat vereist is voor de laatste stap in de synthese van Q (Miyadera *et al.*, 2001; Stenmark *et al.*, 2001). Ubiquinones zijn redox-actieve hydrofobe moleculen bestaande uit een benzylquinone groep met een isoprenoid staart van variabele lengte. Het aantal isoprenoid groepen in de staart is species-specifiek. *C. elegans* maakt Q₉, een quinone met negen isoprenoid groepen. De bacteriën die gebruikt worden als voeding voor *C. elegans* maken Q₈. Jonassen en collega's (2001) toonden aan dat *clk-1* mutanten zowel Q₈, afkomstig van de bacteriële voedingsbron, als grote hoeveelheden demethoxyubiquinone (DMQ9), een Q₉ intermediair, accumuleren i.p.v. Q₉. Bovendien bleken *clk-1* mutanten volledig afhankelijk te zijn van Q₈ uit de voeding om te kunnen ontwikkelen tot adulten. Mutante wormen die gegroeid werden op Q₈-loze bacteriën stopten hun ontwikkeling in het tweede larvale stadium (Jonassen *et al.*, 2001). Indien wormen tijdens het adulte stadium gegroeid werden op een dieet zonder Q, verlengde de levensduur echter en dit zowel in wild type wormen, als in *clk-1* dieren (Larsen en Clarke, 2002). Dit suggereert dat Q afkomstig uit het dieet nefast is voor de levensduur.

Ubiquinones oefenen meerdere functies uit in intracellulaire membranen. Ze hebben o.a. antioxidatieve eigenschappen en functioneren als cofactor voor uridinebiosynthese. Q wordt echter hoofdzakelijk teruggevonden in de binnenste mitochondriale membranen waar het elektronen transfereert van complex I en II naar complex III. Op die manier is *clk-1* dus rechtstreeks verbonden met het metabolisme. Een hypothese die naar voor werd geschoven is dan ook dat de tragere *rate-of-living* in *clk-1* dieren een gevolg is van een vertraging van het metabolisme. Dit gaat gepaard met een lagere productie van ROS en resulteert uiteindelijk in een verlengde levensduur (Lakowski en Hekimi, 1996). Vroege studies naar de metabole snelheid in *clk-1* mutanten toonden echter aan dat de respiratiesnelheid, de productie van warmte en de hoeveelheid ATP niet (veel) lager waren in vergelijking met wild type wormen (Braeckman *et al.*, 1999; Braeckman *et al.*, 2002a; Felkai *et al.*, 1999). Ook de activiteit van de antioxidatieve enzymen SOD en catalase was niet consistent verhoogd ten opzichte van wild type dieren (Braeckman *et al.*, 2002a). Een latere studie maakte gebruik van intacte mitochondriën voor de meting van oxidatieve fosforylatie. Deze benadering toonde aan dat de complex I-afhankelijke oxidatieve fosforylatie sterk verlaagd is in *clk-1* mutanten in vergelijking met wild type dieren. De complex II-afhankelijke oxidatieve fosforylatie was echter normaal. Dus, de abnormale *pool* van Q in *clk-1* mutanten beïnvloedt enkel de transfer van elektronen tussen complex I en III. Verder konden er geen verschillen gedetecteerd worden tussen de individuele ETK complexen van wild type en *clk-1* wormen (Kayser *et al.*, 2004).

Tenslotte werd ook vastgesteld dat CLK-1 in staat is om DNA te binden en dit ter hoogte van de O_L (oorsprong van replicatie) regio van het mitochondriaal DNA. Naast zijn

enzymatische functie in de synthese van Q, heeft CLK-1 dus ook een regulatorische functie. Er werd gesuggereerd dat CLK-1 betrokken is in de regulatie van mtDNA replicatie als respons op de ADP concentratie in de mitochondriën (Gorbunova en Seluanov, 2002).

Evenals *clk-1* vertoont ook *gro-1* een vertraging in een variëteit aan fysiologische processen, alsook een verlengde levensduur en een *maternal effect*. *gro-1* werd dan ook geclassificeerd als een Clk-achtig gen (Lakowski en Hekimi, 1996). Het codeert voor een sterk geconserveerd isopentenylpyrofosfaat:tRNA transferase (IPT), dat een subset aan tRNAs modificeert (Lemieux *et al.*, 2001). Ook het metabolisme van *gro-1* is vergelijkbaar met dat van *clk-1* en vertoont geen noemenswaardige verschillen in respiratie, warmteproductie, ATP-concentratie en metabole capaciteit in vergelijking met wild type wormen (Braeckman *et al.*, 1999; Braeckman *et al.*, 2002a).

isp-1 werd geïsoleerd in een onderzoek naar mutanten die een Clk-achtig fenotype vertoonden (Feng *et al.*, 2001). Naast een sterk vertraagde ontwikkeling en verminderde fertiliteit vertonen *isp-1* mutanten een verlenging van de levensduur met ruim 40%. Het gen codeert voor een Fe-S proteïne dat deel uitmaakt van complex III van de ETK. De snelheid van het elektronentransport en de daaraan gekoppelde consumptie van zuurstof zijn verlaagd in *isp-1* mutanten. Deze dieren bleken ook resistent te zijn tegen oxidatieve stress tengevolge van paraquat. Bovendien was de expressie van *sod-3* verhoogd in *isp-1* dieren. De verhoogde *sod-3* expressie was echter niet noodzakelijk voor de levensduurverlenging in de *isp-1* mutanten. De auteurs concludeerden daaruit dat de verlengde levensduur in deze mutanten een gevolg is van de verlaagde respiratiesnelheid en een verminderde productie van ROS. Een directe meting van de ROS productie werd echter nog niet uitgevoerd in deze mutant.

Dillin en collega's (2002b) onderzochten de rol van de mitochondriën in het verouderingsproces van *C. elegans* door de activiteit van verschillende ETK componenten te inhiberen door middel van RNAi. RNAi inactivering van vier genen (*atp-3*, *nuo-2*, *cyc-1* en *cco-1*) resulteerde in een vertraagde ontwikkeling, een kleiner lichaamvolume, een verlaagde ATP productie en een verlenging van de levensduur. *atp-3* codeert voor een component van het F_0F_1 ATP synthase, *nuo-2* codeert voor een complex I subunit en *cyc-1* maakt deel uit van de cytochroom c familie en codeert voor een component van complex III. *cco-1* tenslotte codeert voor een onderdeel van complex IV. De levensduurverlenging bleek in de vier gevallen onafhankelijk te zijn van de transcriptiefactor DAF-16. Opmerkelijk is dat de RNAi fenotypes niet konden hersteld worden door normale RNA niveaus tijdens het adulte stadium. Dit suggereert dat een verlaagde ETK activiteit tijdens de ontwikkeling een permanente invloed heeft op de regulatie van respiratie en levensduur. In overeenstemming hiermee kon de initiatie van RNAi tijdens het adulte stadium geen verlenging van de levensduur meer veroorzaken (Dillin *et al.*, 2002b).

Een systematisch RNAi onderzoek van de chromosomen I en II toonde aan dat een groot aantal genen die essentieel zijn voor de functie van de mitochondriën, een rol spelen bij de bepaling van de levensduur in *C. elegans* (Lee *et al.*, 2003). Zo werden o.a. verscheidene onderdelen van de vijf ETK complexen geïdentificeerd, alsook mitochondriale carriërs en

ribosomale subunits. In een ander onderzoek naar langlevende mutanten identificeerden Lee en collega's (2003) het mitochondriaal leucyl-tRNA synthetase (*lrs-2*) gen. tRNA synthetasen katalyseren de aminoacetylatie van tRNA's zodat deze het correcte aminozuur kunnen binden. Elk aminozuur heeft een overeenkomstig tRNA synthetase. De mitochondriale tRNA synthetasen van *C. elegans* zorgen voor het opladen van de mitochondriale tRNA's voor de translatie van de 12 polypeptiden die gecodeerd zitten in het mitochondriale genoom. Deze 12 polypeptiden maken deel uit van de verschillende componenten van de ETK. Dus, een mutatie in *lrs-2* tast vermoedelijk het elektronen transport en de productie van ATP aan via een effect op de translatie van de 12 mitochondriale genen. De *lrs-2* mutanten en wormen met RNAi-geïnduceerde mitochondriale defecten hadden allemaal een verlengde levensduur en een verlaagde ATP productie. Daarnaast werd ook een daling van de zuurstofconsumptie en een abnormale mitochondriale morfologie waargenomen. De levensduurverlenging was onafhankelijk van DAF-16, wat suggereert dat de mitochondriale regulatie van de levensduur parallel verloopt aan de DAF-2/insuline signalisatie. Wormen met een defecte mitochondriale functie hadden een hogere resistentie tegen waterstofperoxide en warmte in vergelijking met wild type dieren, maar waren overgevoelig voor paraquat. Mogelijk leidt mitochondriale dysfunctie dus tot de inductie van specifieke defensie systemen en niet tot een vermindering van de hoeveelheid schade die veroorzaakt wordt door de mitochondriën zelf (Anson en Hansford, 2004).

4.3.2.2 Kortlevende Mit mutanten

Niet alle Mit mutanten zijn echter langlevend. *mev-1* werd geïsoleerd op basis van zijn verhoogde gevoeligheid voor paraquat (een superoxide generator) en was de eerste mitochondriale mutatie die geïdentificeerd werd in *C. elegans* (Ishii *et al.*, 1990). Het gen codeert voor een subunit van het enzym succinaat dehydrogenase (SDH) cytochroom b, dat deel uitmaakt van complex II van de ETK (Ishii *et al.*, 1998). De complex II activiteit van *mev-1* dieren vertoont een reductie van meer dan 80% in vergelijking met wild type wormen (Ishii *et al.*, 1998). *mev-1* mutanten zijn ook zeer gevoelig aan zuurstof en hebben een verkorte levensduur in vergelijking met wild type dieren (Ishii *et al.*, 1990; Honda *et al.*, 1993; Ishii *et al.*, 1998). *gas-1* (*general anesthetic-sensitive*) codeert voor een homoloog van het 49 kDa ijzer-houdend proteïne dat deel uitmaakt van complex I van de mitochondriale ETK (Kayser *et al.*, 1999). De mutanten hebben een sterk vertraagde ontwikkeling, een verkorte levensduur en zijn zeer gevoelig aan verhoogde zuurstofconcentraties en oxidatieve stress (Hartman *et al.*, 2001). In *gas-1* mutanten kon een sterke daling van de complex I activiteit vastgesteld worden. Zowel de snelheid waarmee complex I-specifieke substraten gemetaboliseerd werden, als de efficiëntie van ATP productie was verlaagd in *gas-1* wormen (Kayser *et al.*, 2001).

De korte levensduur van zowel *mev-1* als *gas-1* mutanten wordt toegeschreven aan een overgevoeligheid voor oxidatieve stress, aangezien de mitochondriën van deze wormen meer superoxide produceren dan deze van wild type dieren (Senoo-Matsuda *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2005).

4.3.2.3 De drempelwaarde-effect hypothese

Hoe is het te verklaren dat een daling van de ETK activiteit in de ene Mit mutant een verhoogde ROS productie en een verkorting van de levensduur tot gevolg heeft, en in de andere Mit mutant een verlaagde ROS productie en een verlengde levensduur? Een eenvoudige verklaring is dat alle Mit mutanten een zekere residuele ETK activiteit hebben en dat zij functioneren op een niveau dat net boven de drempelwaarde ligt voor totale mitochondriale dysfunctie. Recent werd verondersteld dat de activering van *pathways* die trachten te compenseren voor de verlaagde ETK activiteit een verlenging van de levensduur als neveneffect hebben (Rea, 2005; Ventura *et al.*, 2006). Bij sterkere mitochondriale defecten zijn deze compenserende *pathways* niet meer toereikend wat resulteert in een verkorting van de levensduur (Ventura *et al.*, 2006). Verschillende waarnemingen in de Mit mutanten wijzen op het bestaan van een drempelwaarde-effect voor de regulatie van de levensduur. In de RNAi studie van Lee en collega's (2003) werden niet alleen langlevende mitochondriale mutanten teruggevonden. Sommige RNAi's gericht tegen mitochondriale componenten leidden ook tot steriliteit of lethaliteit in de larvale stadia. Dit suggereert een sterkere daling van de ETK activiteit met deze RNAi clonen. Een ander voorbeeld van een drempelwaarde-effect in Mit mutanten kan gevonden worden in *clk-1* dieren. Als deze mutanten gegroeid worden op bacteriën die geen Q₈ produceren, stoppen ze hun ontwikkeling in het tweede larvale stadium. Indien ze echter gegroeid worden in aanwezigheid van een zeer kleine hoeveelheid Q₈ (5% van het normale endogene Q₈ niveau), kunnen ze toch ontwikkelen tot fertiele adulten (Jonassen *et al.*, 2001). Dus, een daling van de mitochondriale activiteit, bijvoorbeeld door defecten in de ETK, kan een voordeel opleveren onder de vorm van een verlengde levensduur, zolang de functionaliteit van de mitochondriën niet onder een zekere drempelwaarde waarde zakt (Ventura *et al.*, 2006). Ook de species van Q die aanwezig is in de wormen zou een rol kunnen spelen in de bepaling van het type schade door ROS (Sedensky en Morgan, 2006).

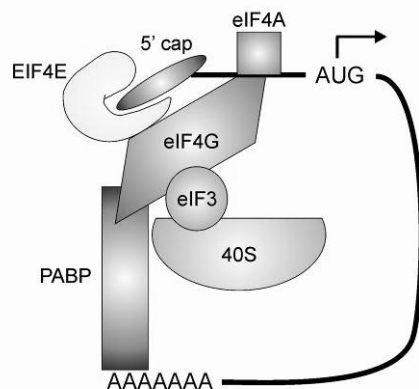
4.3.3 AAK-2

AAK-2 (*AMP-activated protein kinase*) wordt geactiveerd door een hoge AMP/ATP ratio veroorzaakt door stresserende condities of normale veroudering in *C. elegans* en koppelt zo de beschikbare hoeveelheid energie aan veroudering. Overexpressie van *aak-2* resulteert in een verlenging van de levensduur met 13%, terwijl een mutatie in het gen leidt tot een verkorting van de levensduur met 12% (Apfeld *et al.*, 2004). Hoewel aangetoond werd dat AAK-2 onafhankelijk van DAF-16 functioneert, blijkt het toch een rol te spelen bij insuline signalisatie, aangezien de verlengde levensduur van *daf-2* mutanten gedeeltelijk kon onderdrukt worden door een mutatie in dit gen (Apfeld *et al.*, 2004). AAK-2 behoort tot een geconserveerde familie van eukaryote proteïne kinasen die de cellulaire energie niveaus herstellen door catabole reacties (glycolyse en vetzuuroxidatie) te bevorderen en vetzuur en proteïnesynthese reacties te inhiberen (Hardie, 2004). Recent werd aangetoond dat AAK-2 in *C. elegans* een rol speelt bij de regulatie van het verouderingsproces door signalen afkomstig van verschillende levensduur-regulerende *pathways* te integreren (Curtis *et al.*, 2006). Zo onderdrukt een mutatie in *aak-2* gedeeltelijk de levensduurverlenging tengevolge

van de mitochondriale mutaties *isp-1* en *clk-1*. De hogere AMP/ATP ratio van deze mutanten veroorzaakt mogelijk een activering van AAK-2 wat op zijn beurt aanleiding geeft tot een verlenging van de levensduur. Ook de verlengde levensduur van wormen die *sir-2.1* overexpresseren werd gedeeltelijk onderdrukt door een mutatie in *aak-2*. Dit suggereert dat informatie over beschikbare cellulaire energie (AMP/ATP ratio) en redoxtoestand (NAD^+/NADH ratio) geïntegreerd wordt bij de controle van de levensduur in *C. elegans*. *Germline* signalisatie en calorische restrictie worden daarentegen onafhankelijk van *aak-2* gereguleerd (Curtis *et al.*, 2006). Dus, AAK-2 functioneert als een zogenaamd knooppunt in het complexe netwerk van *pathways* die de levensduur van *C. elegans* controleren.

4.3.4 mRNA translatie

De synthese van nieuwe eiwitten is een sterk gereguleerd proces dat de beschikbare hoeveelheid nutriënten koppelt aan de groei en de ontwikkeling van het organisme. Het translatieproces wordt onderverdeeld in drie fasen: initiatie, elongatie en terminatie. Vooral de initiatiefase is zeer strikt gereguleerd. Deze fase is een complex proces dat begint met de interactie van het eIF4F (eukaryote initiatiefactor 4F) initiatiecomplex met de *cap* structuur aan het 5' uiteinde van het mRNA. Het eIF4F complex is opgebouwd uit drie subunits (Fig. 4.8): eIF4E, dat een *cap*-bindend proteïne is; eIF4A, dat een RNA helicase is en het *scaffold* proteïne eIF4G dat een verbinding maakt tussen het mRNA en het ribosoom via eIF3, dat rechtstreeks bindt op het ribosoom. De geassocieerde PABP's (*Poly-(A) Binding Protein*) zorgen voor de cirkularisatie van de mRNA's, met een verhoogde affiniteit van eIF4E voor de 5' *cap* structuur tot gevolg (Borman *et al.*, 2000; Holcik en Sonenberg, 2005).



Figuur 4.8: Samenstelling van het translatie-initiatiecomplex ter hoogte van de *cap* structuur aan het 5' uiteinde van het eukaryoot mRNA.

Een aantal recente studies identificeerden mRNA translatie als een belangrijke regulator van de levensduur in *C. elegans*. Een mutatie in *ife-2* (een eIF4E isovorm die enkel in somatische weefsels voorkomt) had een verlengde levensduur tot gevolg (Syntichaki *et al.*, 2007). Door middel van FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) werd aangetoond dat de snelheid van proteïnesynthese vertraagd was in deze mutant. Bovendien waren de *ife-2* mutanten resistent tegen oxidatieve stress (geïnduceerd door paraquat en NaN_3) dan wild type dieren. De verlengde levensduur van de *ife-2* mutanten kon niet onderdrukt worden door een mutatie in *daf-16*. Bovendien kon een *ife-2* mutatie de levensduur van de

langlevende *daf-2* en *age-1* mutanten verder verlengen. Dit toont aan dat *ife-2* de levensduur controleert onafhankelijk van de INS/IGF-1 *pathway*. De observatie dat de uitschakeling van *ife-2* ook de levensduur van de langlevende *clk-1* en *eat-2* mutanten (deze laatste zijn een genetisch model voor calorische restrictie, zie verder) kon verlengen, leidde tot de conclusie dat IFE-2 activiteit een nieuw mechanisme voorstelt dat de levensduur van *C. elegans* kan beïnvloeden (Syntichaki *et al.*, 2007). Het ribosomale S6 kinase (S6K) fosforyleert en activeert (onder de controle van TOR, zie verder) het ribosomale eiwit S6 op verschillende serineresiduen en is een centrale regulator van mRNA translatie en groei. Een mutatie in *rsks-1*, dat codeert voor het *C. elegans* S6K, leidde tot een verlenging van de levensduur en een verlaagde mRNA translatie in vergelijking met wild type wormen. De snelheid van proteïnesynthese werd gemeten via de incorporatie van ³⁵S-methionine na blootstelling van de wormen aan ³⁵S-methionine-gelabelde bacteriën (Pan *et al.*, 2007). RNAi inactivering van eIF4G of eIF2β (β subunit van de GDP/GTP uitwisselingsfactor voor eIF2) tijdens het adulte stadium veroorzaakte eveneens een verlenging van de levensduur (Henderson *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2007). Dit ging in het geval van eIF4G ook gepaard met een vertraagde mRNA translatie (Pan *et al.*, 2007). RNAi inactivering van eIF4G of *rsks-1* in combinatie met een mutatie in *daf-2*, *clk-1*, *sir-2.1* of *eat-2* resulteerde telkens in een verdere verlenging van de levensduur (Pan *et al.*, 2007). Hansen en collega's (2007) tenslotte vertraagden het translatieproces door RNAi inactivering van ribosomale proteïnen, S6K of translatie-initiatiefactoren en vonden in de drie gevallen een verlengde levensduur die onafhankelijk was van *sir-2.1*. Ook zij observeerden een verhoogde stressresistentie (onder de vorm van een verhoogde thermotolerantie) in de translatie-geïnhibeerde wormen.

Over de betrokkenheid van DAF-16 in de verlengde levensduur van translatie-geïnhibeerde wormen bestaat enige onduidelijkheid. Enerzijds werd aangetoond dat RNAi inactivering van ribosomale proteïnen en S6K (*rsks-1*) de levensduur verlengde onafhankelijk van *daf-16* (Hansen *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007) en dat de verlengde levensduur tengevolge van de inhibitie van de translatie-initiatiefactoren eIF4G en eIF2β DAF-16-afhankelijk was (Henderson *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2007). Een andere studie toonde echter aan dat de levensduurverlenging tengevolge van de inactivering van translatie-initiatiefactoren onafhankelijk was van DAF-16 (Pan *et al.*, 2007). De reden voor deze tegenstelling is tot op heden onduidelijk, hoewel verschillen in de RNAi constructen mogelijk aan de basis kunnen liggen. Dus, de initiatie van mRNA translatie speelt een belangrijke rol in de regulatie van de levensduur in *C. elegans* en is vermoedelijk grotendeels onafhankelijk van de reeds gekende levensduurregulerende *pathways*.

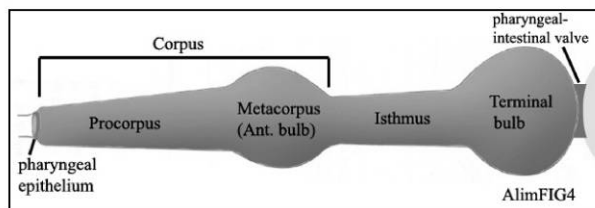
De synthese van nieuwe eiwitten wordt geïnhibeed als respons op de meeste vormen van cellulaire stress (Holcik en Sonenberg, 2005). Aangezien het translatieproces afhankelijk van het organisme tot ongeveer 50% van de totale cellulaire energie opsloopt, resulteert de inhibitie van dit proces in een aanzienlijke energiebesparing. De toegenomen hoeveelheid beschikbare energie zou kunnen gebruikt worden voor de inductie van mechanismen ter bescherming van het organisme, wat op zijn beurt zou kunnen bijdragen tot een verlengde levensduur. De verhoogde resistentie tegen oxidatieve en warmtestress die wordt waargenomen na inhibitie van verschillende translatie-initiatiefactoren lijkt deze hypothese te ondersteunen (Syntichaki en Tavernarakis, 2006; Henderson *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2007; Syntichaki *et al.*, 2007).

4.3.5 Calorische restrictie

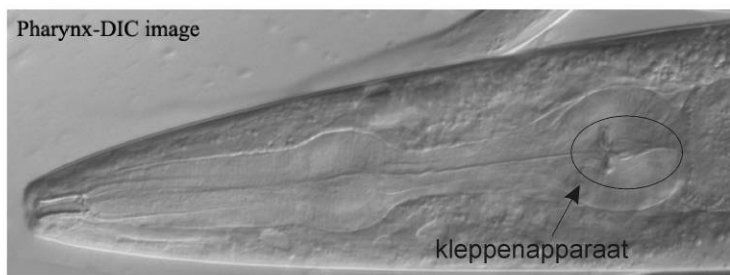
4.3.5.1 Opname van voedsel

4.3.5.1.1 De farynx

C. elegans is een filtervoeder, wat betekent dat hij vloeistof opneemt met daarin gesuspendeerde bacteriën. De bacteriën worden weerhouden, waarna de vloeistof weer uitgestoten wordt. De voedselpartikels worden van de mond naar de darm getransfereerd door de farynx. Deze neuromusculaire buis zorgt voor het opnemen, concentreren en verwerken van het voedsel vooraleer het getransporteerd wordt naar de darm (Avery en Thomas, 1997). De farynx bestaat uit vier delen (Fig. 4.9): de procorpus die in contact staat met de mond, de bolvormige metacorus, een cilindrische isthmus en een terminaal gelegen verbreding met kleppenapparaat dat gekoppeld is aan de darm (Albertson en Thomson, 1976).



Figuur 4.9: Schematische voorstelling en microscopische opname van de farynx, met aanduiding van de verschillende onderdelen (www.wormatlas.org).



De spieren van de corpus en de isthmus zijn radiaal georiënteerd, zodat hun contractie resulteert in de opening van het lumen en de instroom van vloeistof samen met gesuspendeerde bacteriën. Bij relaxatie zal het lumen van de pharynx weer sluiten, wat gepaard gaat met de uitstoot van vloeistof via de mond. De meeste bacteriën zullen in de farynx weerhouden worden. Tijdens opeenvolgende pompbewegingen worden ze achterwaarts getransporteerd naar de isthmus (Avery, 1993). Elke vierde pompbeweging wordt gevolgd door isthmusperistaltiek, waarbij de bacteriën van de isthmus worden verplaatst naar de terminale verbreding. Uiteindelijk zal contractie van de terminale verbreding de platen van het kleppenapparaat inverteren, waarna de aanwezige bacteriën vermalen worden en doorgegeven worden aan de darm (Avery en Thomas, 1997). Onder standaard laboratoriumcondities (op agarplaten met een overmaat bacteriën), pompen

normale wormen bijna continu aan een gemiddelde snelheid van ongeveer 260 pompbewegingen per minuut (Avery en Horvitz, 1989; Raizen *et al.*, 1995).

4.3.5.1.2 De darm

De darm is een goede kandidaat voor de plaats waar de effecten van CR gemedieerd worden in *C. elegans* (Walker *et al.*, 2005). De biologie van de vertering is echter grotendeels onontgonnen terrein in dit voor het overige goed gekarakteriseerde organisme. De darm van *C. elegans* is buisvormig en wordt omgeven door een enkele cellaag. In tegenstelling tot zoogdieren dient de darm in deze nematode niet enkel voor de vertering en absorptie van nutriënten, maar het is ook de plaats waar vetreserves worden gesynthetiseerd en opgeslagen. In zoogdieren worden deze functies uitgeoefend door de lever en het vetweefsel. De darmcellen van *C. elegans* zijn gepolariseerd met microvilli aan de lumenale zijde. De basolaterale membraan van de darmcellen staat in contact met het pseudocoeloom dat gevuld is met een vloeistof die het transport van nutriënten toelaat naar de verschillende weefsels (Avery en Thomas, 1997; Fei *et al.*, 2003). Vroege studies suggereren dat de intestinale cellen nutriënten absorberen via endocytose. Zo werd waargenomen dat het toevoegen van geprecipiteerd materiaal aan chemisch gedefinieerd medium bevorderlijk was voor de groei van nematoden (Vanfleteren, 1974). Een visueel bewijs voor endocytose werd bekomen door *C. elegans* te voeden met fluorescent gelabelde proteïne of dextran probes van verschillende grootte. Deze probes accumuleerden in de autofluorescente granules van de darmcellen, wat een opname via pinocytose suggereert (Clokey en Jacobsen, 1986).

Meer recent werden met de identificatie van een aantal intestinale transporterproteïnen nieuwe inzichten bekomen in de biologie van nutriëntopname in *C. elegans*.

4.3.5.1.2.1 Natrium-gekoppelde transporters

Een mutatie in *Indy* (*I'm not dead yet*), een dicarboxylaat cotransporter van Krebscyclus-intermediären, verlengt de levensduur in *Drosophila* (Rogina *et al.*, 2000). In *C. elegans* werden drie *Indy* homologen geïdentificeerd: *nac-1*, *nac-2* en *nac-3* (Fei *et al.*, 2003; Fei *et al.*, 2004). Door middel van heterologe expressiesystemen werd de biochemie van deze transporters in detail bestudeerd. De NACs zijn Na⁺ symporters, wat wil zeggen dat de opname van nutriënten gekoppeld is aan het cotransport van Na⁺ ionen. NAC-1 en NAC-3 zijn dicarboxylaat transporters, terwijl NAC-2 een dicarboxylaat/tricarboxylaat transporter is. De drie transporters komen exclusief tot expressie in de cellen van de darm. Ze zijn allen in staat om succinaat te transporteren, maar NAC-2 transporteert citraat op veel efficiëntere wijze. Citraat is niet enkel een Krebscyclusintermediair, maar is ook een precursor voor de synthese van vetzuren, cholesterol en isoprenoïden.

Reductie van *nac-2* en *nac-3* genexpressie via RNAi veroorzaakte een verlenging van de levensduur met respectievelijk 15 en 19% (Fei *et al.*, 2003; Fei *et al.*, 2004). *Nac-2* RNAi ging bovendien gepaard met een \pm 40% verminderde grootte en een 44% reductie van de

hoeveelheid vet in de darm (Felkai *et al.*, 2004). Er werd dan ook gesuggereerd dat het uitschakelen van *nac-2* en *nac-3* leidt tot een verstoorde opname van succinaat en andere Krebscyclusintermediären en bijgevolg een verminderde productie van energie. Dit zou een metabole toestand veroorzaken vergelijkbaar met CR (Fei *et al.*, 2003; Fei *et al.*, 2004). In een zeer recente studie werden bovenstaande waarnemingen echter ontkracht (Toivonen *et al.*, 2007). *nac-2* en *nac-3* RNAi in *C. elegans* veroorzaakte wel een daling van de respectievelijke hoeveelheden mRNA, maar dit ging niet gepaard met een verlengde levensduur. Ook een *Drosophila Indy* mutant was niet langlevend.

4.3.5.1.2.2 De *pep-2* en *nhx-2* transporters

De opname van aminozuren gebeurt in alle organismen via membraangebonden carriers die ofwel vrije ofwel peptide-gebonden aminozuren opnemen. Het *C. elegans* genoom bevat twee peptide transporters die homoloog zijn aan de humane *pept1* en *pept2* genen. Dit zijn respectievelijk *pep-2* en *pep-1*. *C. elegans pep-2* komt voor in de apicale membraan van de intestinale cellen en is verantwoordelijk voor de H⁺-afhankelijke opname van di- en tripeptiden uit het darmlumen (Fei *et al.*, 1998). Een mutatie in *pep-2* veroorzaakt een sterke vertraging van de ontwikkeling, een verminderde fertiliteit, een reductie van de lichaamsgrootte en een verhoogde stressresistentie (Meissner *et al.*, 2004). Dit wijst op een specifiek tekort aan de opname van voedsel-afgeleide peptiden in de darmcellen als bron van aminozuren. Het toedienen van vrije aminozuren kon dit fenotype slechts in beperkte mate compenseren. Het feit dat *pep-2* mutanten niet in staat waren om fluorescente reportermoleculen te absorberen, bevestigde dat PEP-2 de enige functionele peptide transporter is in de darm van *C. elegans* (Meissner *et al.*, 2004).

Omdat PEP-2 het inwaartse transport van di- en tripeptiden koppelt aan de opname van H⁺, gaat de absorptie van peptiden gepaard met een verzuring van het cytoplasma. Dit wordt voorkomen door de activiteit van NHX-2, een Na⁺/H⁺ uitwisselaar die de elektroneutrale uitwisseling van extracellulair Na⁺ voor intracellulair H⁺ bewerkstelligt (Nehrke, 2003). Door gebruik te maken van GFP fusies werd aangetoond dat beide proteïnen tot expressie komen ter hoogte van de apicale membraan van de darmcellen. Wormen die *nhx-2* RNAi ondergingen, waren korter en slanker en accumuleerden bijna geen vet in vergelijking met controlewormen. Bovendien leefden ze ongeveer 40% langer (Nehrke, 2003). Ook RNAi inactivering van *pep-2* veroorzaakte een sterk gereduceerde opslag van vet (Ashrafi *et al.*, 2003; Nehrke, 2003), maar dit ging niet gepaard met een verlenging van de levensduur (Nehrke, 2003; Meissner *et al.*, 2004). Deze observaties suggereren dat een verminderde beschikbaarheid van nutriënten voor de productie van energie, na uitschakeling van *pep-2* of *nhx-2*, aanleiding geeft tot een metabole toestand vergelijkbaar met CR. Het feit dat *pep-2* RNAi een zwakker fenotype veroorzaakte dan *nhx-2* RNAi impliceert dat de disruptie van *nhx-2* de activiteit van meerdere transporters beïnvloedt (Nehrke, 2003).

4.3.5.2 Methoden voor calorische restrictie in *C. elegans*

Verschillende moeilijkheden duiken op wanneer men *C. elegans* wil onderwerpen aan calorische restrictie. Er werd namelijk gesuggereerd dat *E. coli*, de normale voedselbron van *C. elegans* in het laboratorium, lichtjes toxisch en infectueus is, en dit in toenemende mate met stijgende leeftijd (Croll *et al.*, 1977; Gershon en Gershon, 2002). Garigan en collega's (2002) konden inderdaad vaststellen dat bacteriën frequent accumuleren in de farynx en de darm van oude wormen. Wanneer wormen gevoed werden met *E. coli* die gedood werd door ultraviolette bestraling of antibiotica, leidde dit tot een levensduurverlenging van 20-40% (Gems en Riddle, 2000b; Garigan *et al.*, 2002). Als de bacteriën behandeld werden met een bacteriostaticum, werd een gelijkaardige verlenging van de levensduur waargenomen. Bovendien hadden wormen die op deze niet-prolifererende bacteriën gegroeid werden veel minder last van constipatie, wat suggereert dat iets geassocieerd met bacteriële groei de levensduur van de wormen verlaagt (Garigan *et al.*, 2002). Deze bevindingen zijn in overeenstemming met eerdere rapporten die suggereren dat toxines, geproduceerd door prolifererende bacteriën, de levensduur van *C. elegans* negatief zouden kunnen beïnvloeden (Hansen *et al.*, 1964; Croll *et al.*, 1977). Een vermindering van de beschikbare hoeveelheid *E. coli* verlengt de levensduur dus niet enkel door een reductie van het aantal calorieën, maar ook door een verminderde blootstelling aan de nefaste effecten van deze bacterie.

Een tweede moeilijkheid bij het bestuderen van CR in *C. elegans* is dat de voordelige effecten van een verminderde voedselopname mogelijk teniet gedaan worden door ondervoeding, aangezien zowel calorieën als essentiële nutriënten afkomstig zijn van dezelfde bacteriële voedselbron. Een gereduceerde opname van *E. coli* vermindert dus ook de beschikbaarheid van componenten die noodzakelijk zijn voor een maximale verlenging van de levensduur (Houthoofd *et al.*, 2005c).

Tenslotte werd waargenomen dat wormen die gegroeid werden op ubiquinone-deficiënte *E. coli* cellen een verlengde levensduur hebben (Larsen en Clarke, 2002). Een verminderde opname van bacteriën zou dus kunnen leiden tot een verlenging van de levensduur door een lagere opname van ubiquinone. Voordelige effecten tengevolge van een verminderde voedselopname zijn bijgevolg niet enkel te wijten aan een reductie van het aantal calorieën (Houthoofd *et al.*, 2007).

Ondanks bovenstaande potentiële problemen, werden toch verschillende methoden gebruikt om de effecten van calorische restrictie te onderzoeken in *C. elegans*. Drie groepen van methoden worden onderscheiden: verdunning van de bacteriële voedselbron, het gebruik van mutanten die zich niet normaal kunnen voeden, en groei in een semi-gedefinieerd vloeibaar medium in afwezigheid van *E. coli* (Walker *et al.*, 2005).

4.3.5.2.1 Verdunning van de voedselbron

De eerste experimenten waarbij de levensduur van *C. elegans* verlengd werd door de voedselinname te beperken, werden uitgevoerd door Klass (1977). Hij verminderde de concentratie van bacteriën in buffer. De fertiliteit van de wormen was maximaal in aanwezigheid van 10^9 cellen/ml. Wanneer de densiteit aan bacteriën verminderd werd tot 10^8 cellen/ml, verlengde de levensduur met 60%. Onder deze omstandigheden verminderde de productie van nakomelingen meer dan viervoudig. Lagere concentraties aan bacteriën (5×10^7 cellen/ml en minder) veroorzaakten een reductie van de levensduur en een zeer sterke daling van de fertiliteit tengevolge van verhongering. Een toename van de bacteriële concentratie (tot 10^{10} cellen/ml) leidde eveneens tot een daling van de levensduur en de fertiliteit, maar dit was waarschijnlijk een gevolg van een tekort aan zuurstof. Er werd ook aangetoond dat hoe vroeger de wormen gerestricteerd werden, hoe groter het positieve effect was op de levensduur (Klass, 1977). Blijkbaar is de reproductieve fase het meest gevoelig aan veranderingen in voedselconcentratie. Als het voedselaanbod beperkt werd op dag 8 (postreproductieve fase), kon er geen significante verlenging van de levensduur waargenomen worden.

Een alternatieve methode die gebruik maakt van voedselverdunning werd voorgesteld door Hosono en collega's (1989). Zij verminderden de concentratie aan nutriënten in de standaard NGM platen waardoor de laag bacteriën minder dik werd. Opnieuw werd er een omgekeerd evenredig verband gevonden tussen de beschikbare hoeveelheid voedsel en de levensduur. Op platen zonder bactopecton, maar met een laagje bacteriën in suspensie, werd een maximale levensduurverlenging van 30% waargenomen. Er werd ook aangetoond dat de toename van de levensduur niet veroorzaakt werd door de afwezigheid van bactopecton, aangezien de levensduur ook toenam als de wormen gegroeid werden op platen met bactopecton in aanwezigheid van chloramfenicol-behandelde bacteriën (die niet meer kunnen delen). Deze resultaten suggereren dat ofwel de proliferatie van *E. coli* ofwel de hogere concentratie van bacteriën onder bactopecton-rijke condities limiterend is voor de levensduur van *C. elegans* (Hosono *et al.*, 1989).

4.3.5.2.2 eat mutanten

Een verminderde opname van bacteriën kan ook genetisch bekomen worden door het gebruik van *eat* mutanten. Deze mutanten werden ontdekt in een onderzoek naar genen die een rol spelen bij de functie van de exciteerbare cellen van de farynx. *eat* mutanten vertonen een variëteit aan defecten in de faryngeale pompbeweging, wat resulteert in een inefficiënte opname van voedsel en een karakteristiek verhongerd uitzicht (Avery, 1993). De mutaties veroorzaken zowel defecten in de structuur en de exciteerbaarheid van de faryngeale spieren als in de functie van het zenuwstelsel. Dit heeft tot gevolg dat bepaalde *eat* mutaties de sterkte of de opeenvolging van contracties en relaxaties van de faryngeale spieren beïnvloeden. Andere *eat* mutaties veroorzaken een drastische daling van de pompsnelheid (Avery, 1993; Raizen *et al.*, 1995). Omdat deze wormen een verhongerd uitzicht hebben (*eat* mutanten zijn klein en bleek) werden ze gebruikt om de opname van

voedsel te beperken. Er werd vervolgens waargenomen dat veel van deze mutanten een verlengde levensduur hebben (Lakowski en Hekimi, 1998). 14 van de 17 mutanten vertoonden een significante verlenging van de levensduur, met een maximale verlenging van bijna 60%. In *eat-2* en *eat-6* bleek de sterkte van het voedingsdefect bovendien gecorreleerd te zijn met de levensduur. De auteurs concludeerden dan ook dat *eat* mutanten langer leven tengevolge van calorische restrictie (Lakowski en Hekimi, 1998). Drie *eat* mutanten worden hieronder in meer detail besproken.

4.3.5.2.2.1 *eat-1*

Proteïnen die deel uitmaken van de ALP/Enigma familie spelen in de spieren van vertebraten een belangrijke rol in de verankering van actinefilamenten. Het *C. elegans* genoom bevat één gen dat via alternatieve *splicing* codeert voor zowel de ALP als voor de Enigma isovorm. Een GFP::Enigma fusieproteïne komt tot expressie in de spieren ter hoogte van de ankerplaatsen van de actinefilamenten. RNAi gericht tegen ALP/Enigma veroorzaakte onregelmatige faryngeale pompbewegingen, een trage voortbeweging en een slank uitzicht. Dit fenotype komt overeen met het fenotype van *eat-1* mutanten. Bovendien zijn beide allelen gelokaliseerd in dezelfde chromosomale regio, wat suggereert dat het gaat om hetzelfde gen. In overeenstemming hiermee kon de introductie van ALP/Enigma genomisch DNA het *eat-1* fenotype volledig onderdrukken (McKeown en Beckerle, 2001). Een latere publicatie over de rol van ALP/Enigma in *C. elegans* zegt echter niets over het *eat-1* gen (McKeown *et al.*, 2006). De exacte functie van EAT-1 blijft dus voorlopig nog onduidelijk.

4.3.5.2.2.2 *eat-2*

De farynx van wild type wormen vertoont een verschillende pompsnelheid naargelang de omgevingsomstandigheden. In afwezigheid van voedsel pompt de farynx ongeveer één maal per seconde. In aanwezigheid van voedsel verhoogt de pompsnelheid echter tot vier pompbewegingen per seconde. Het exciterende faryngeale motorneuron MC is verantwoordelijk voor de regulatie van de snelle pompbeweging (Avery en Horvitz, 1989; Raizen *et al.*, 1995). Het *eat-2* gen codeert voor een nicotine-acetylcholinereceptorsubunit en mutanten in dit gen hebben een defecte MC neurotransmissie (Raizen *et al.*, 1995; McKay *et al.*, 2004). Door middel van een *eat-2* transgen onder de controle van een spier-specifieke promotor werd aangetoond dat EAT-2 een postsynaptische functie heeft in de faryngeale spier. Met behulp van een GFP fusie werd ook waargenomen dat EAT-2 tot expressie komt ter hoogte van de MC synaps. Uit deze waarnemingen werd geconcludeerd dat EAT-2 de postsynaptische receptor is voor het MC motorneuron. Stimulatie van de acetylcholinereceptor door MC veroorzaakt een opening van het EAT-2 kanaal, wat op zijn beurt leidt tot de opening van een voltage-geactiveerd calciumkanaal. Dit resulteert uiteindelijk in de contractie van de farynx. De snelheid waarmee MC signalen doorgeeft, bepaalt de snelheid van de faryngeale pompbeweging (McKay *et al.*, 2004).

4.3.5.2.2.3 *eat-6*

Door middel van een elektrofaryngeogram (EPG) is het mogelijk om het effect van bv. een mutatie of een drug op de elektrische activiteit van de faryngeale spieren na te gaan. Een EPG wordt uitgevoerd door de mond van een worm in een pipet te zuigen en vervolgens de in- en uitgaande elektrische stromen te meten. Deze stromen zijn een gevolg van veranderingen in de actiepotentialen van de faryngeale spieren en de postsynaptische potentialen tengevolge van synaptische transmissies van de faryngeale neuronen naar de faryngeale spieren (Raizen en Avery, 1994). Wormen met een mutatie in het *eat-6* gen vertonen een zwakkere contractie en een vertraagde relaxatie van de farynx en er werd gesuggereerd dat het gen betrokken zou zijn bij de regulatie van de excitatie van de faryngeale spieren (Avery, 1993). Met behulp van een EPG werd aangetoond dat een mutatie in *eat-6* inderdaad een invloed heeft op de membraanpotentiaal van de faryngeale spieren (Davis *et al.*, 1995). *eat-6* codeert voor een Na,K-ATPase subunit en is voornamelijk actief in de spieren. Behalve een verstoorde werking van de farynx hebben *eat-6* mutanten echter geen andere opvallende defecten zoals bv. in de voortbeweging (Davis *et al.*, 1995).

4.3.5.2.3 *Groei in axenisch medium*

De grootste toename in de levensduur tengevolge van een veranderde voedselinname, wordt geobserveerd wanneer *C. elegans* gekweekt wordt in axenisch medium. De term axenisch verwijst naar het feit dat de wormen gegroeid worden in afwezigheid van andere organismen. Een voorbeeld van een dergelijk medium is CbMM of *Caenorhabditis briggsae* Maintenance Medium, een volledig gedefinieerd medium dat bestaat uit 56 componenten (zie tabel 4.1). De samenstelling is gebaseerd op de verhoudingen aan aminozuren in *E. coli* (Roberts *et al.*, 1955; Sayre *et al.*, 1963). Het medium is rijk aan aminozuren, vitaminen en groeifactoren. De bereiding ervan is echter vrij duur en zeer arbeidsintensief. Daarom wordt er gewoonlijk gebruik gemaakt van een semi-gedefinieerd medium dat 3% gistextract en 3% soja pepton bevat (Vanfleteren, 1978; Houthoofd *et al.*, 2002b). Omdat *C. elegans* niet in staat is om zelf haem aan te maken, moet dit toegevoegd worden aan het medium. Oorspronkelijk werd het toegevoegd onder de vorm van weefselextracten (bijvoorbeeld van lever of kippenembryo's), maar later werd dit vervangen door 0.5 mg/ml pure haemoglobine (Vanfleteren, 1980). Spore-hoeveelheden aan sterolen zijn aanwezig als onzuiverheden in de andere componenten van het medium. Axenisch gekweekte wormen vertonen een toename van de levensduur met 50-80% in vergelijking met monoxenische wormen en dit effect is zeer reproduceerbaar. Verder hebben de dieren een vertraagde ontwikkeling, zijn ze slanker en bleker en produceren ze aanzienlijk minder nakomelingen. Deze kenmerken worden ook waargenomen bij wormen die gegroeid worden in aanwezigheid van lage concentraties aan bacteriën (Vanfleteren en Braeckman, 1999; zie ook Hoofdstuk 7.1).

Component	Concentration (mM)	Component	Concentration (mM)
<i>Essential amino acids</i>		<i>Vitamins and growth factors</i>	
L-Arginine	7.45	<i>N</i> -Acetylglucosamine	6.7×10^{-3}
L-Histidine	2.43	DL-Alanine	168.0×10^{-3}
L-Isoleucine	8.74	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	54.0×10^{-3}
L-Leucine	14.60	Biotin	15.3×10^{-3}
L-Lysine	9.37	Cyanocobalamine	2.8×10^{-3}
L-Methionine	3.47	Folate	7.3×10^{-3}
L-Phenylalanine	5.03	Niacin	61.0×10^{-3}
L-Threonine	8.03	Niacinamide	61.1×10^{-3}
L-Tryptophane	1.20	Pantetheine	13.3×10^{-3}
L-Valine	11.62	Pantothenate	29.0×10^{-3}
<i>Nonessential amino acids</i>		Pteroylglutamic acid	16.9×10^{-3}
L-Alanine	20.8	Pyridoxal.HCl	18.3×10^{-3}
L-Asparagine	16.2	Pyridoxamine.2HCl	15.5×10^{-3}
L-Cysteine	0.21	Pyridoxine.HCl	36.4×10^{-3}
L-Glutamic	4.32	Riboflavin 5.PO ₄	14.6×10^{-3}
L-Glutamine	13.0	Thiamine.Cl.HCl	22.2×10^{-3}
L-Glycine	12.81	DL-Thioctic acid	18.8×10^{-3}
L-Proline	7.55	<i>Other growth factors</i>	
L-Serine	10.0	Glutathione, reduced	1.33
L-Tyrosine	2.0	Choline chloride	6.34
L-Phenylalanine	1.45	i-Inositol 2H ₂ O	3.59
α - ϵ -Diaminopimelic acid	0.72	<i>Energy source</i>	
<i>Salt solutions</i>		D-Glucose	7.3
KH ₂ PO ₄	9.0	<i>Nucleic acid substituents</i>	
KOH	16.5	Adenylic acid	1
Mg.H.Citrate.5H ₂ O	3.0	Cytidylic acid	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.5	Guanylic acid	1
K ₃ Citrate	1.5	Uridylic acid	1
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	0.15	Thymine	1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.113		
ZnCl ₂	0.075		
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.038		

Tabel 4.1: Samenstelling van *Caenorhabditis briggsae* Maintenance Medium (CbMM) (Sayre *et al.*, 1963).

4.3.5.3 Mechanismen van levensduurverlenging door CR

Het mechanisme dat aan de basis ligt van de levensduurverlengende effecten van CR is vooralsnog onbekend. Een verscheidenheid aan hypothesen werd in de loop der jaren naar voor geschoven (Bergamini *et al.*, 2003; Masoro, 2005; Sinclair, 2005). Een overzicht van de mogelijke mechanismen in *C. elegans* wordt hieronder weergegeven (Walker *et al.*, 2005; Houthoofd *et al.* 2007).

4.3.5.3.1 Gereduceerde metabole snelheid

Zoals eerder vermeld, werd in het begin van de 20^{ste} eeuw een omgekeerd evenredig verband vastgesteld tussen de levensduur en de metabole snelheid, wat leidde tot de formulering van de *rate-of-living* hypothese (Pearl, 1928). Deze theorie herleefde in de jaren 50, met de opstelling van de vrije-radicaaltheorie voor veroudering door Harman. Volgens zijn visie zou een lagere metabole snelheid leiden tot een verminderde ROS productie door de mitochondriën met een vertraging van veroudering tot gevolg (Harman, 1966). Een veel voorgesteld mechanisme voor de levensduurverlenging door CR is dan ook een verlaging van het metabolisme. Dit lijkt logisch aangezien er bij CR minder brandstof voorhanden is om de mitochondriale elektronentransportketen aan te drijven. Tegenwoordig wordt het echter steeds duidelijker dat een hoger metabolisme niet noodzakelijk gekoppeld is aan een hogere productie van ROS, aangezien de vorming van vrije radicalen afhankelijk is van de potentiaal van de binnenste mitochondriale membraan en dus niet van de snelheid van het elektronentransport (Korshunov *et al.*, 1997; Brand, 2000). De membraanpotentiaal en de ROS productie blijken zelfs omgekeerd evenredig te zijn met de respiratorische activiteit (Merry, 2002; Nicholls, 2004). Hoe hoger de respiratiesnelheid, hoe lager de mitochondriale membraanpotentiaal en hoe minder tijd de elektronen doorbrengen ter hoogte van de plaatsen waar lekkage mogelijk is. De productie van ROS zal bijgevolg laag zijn in actief respirerende mitochondriën en hoog in rustende mitochondriën (Nicholls, 2004). Naast de activiteit van het ATP synthetasecomplex, zorgen ook ontkoppelingseiwitten voor een verlaging van de membraanpotentiaal en dit gaat opnieuw gepaard met een verminderde productie van ROS (Brand, 2000). Zo werd bijvoorbeeld vastgesteld dat in een muizenpopulatie de individuen met de hoogste metabole snelheid, de sterkste mitochondriale ontkoppeling en de langste levensduur hadden (Speakman *et al.*, 2004).

In een poging om de interactie te bestuderen tussen calorische restrictie en metabole snelheid, construeerden Lakowski en Hekimi (1998) *eat-2;clk-1* dubbelmutanten. Deze dubbelmutanten leefden niet langer dan elk van de afzonderlijke mutanten, wat suggereert dat *eat-2* en *clk-1* veroudering via een gemeenschappelijk proces zouden kunnen beïnvloeden (Lakowski en Hekimi, 1998). Aangezien op dat ogenblik verondersteld werd dat de verlengde levensduur van *clk-1* mutanten een gevolg was van een gereduceerde metabole snelheid (Lakowski en Hekimi, 1996), werd geconcludeerd dat CR het verouderingsproces eveneens vertraagt door een verlaging van het metabolisme (Lakowski en Hekimi, 1998). Latere studies konden echter geen verschillen in zuurstofconsumptie of warmteproductie aantonen tussen *clk-1* mutanten en wild type dieren (Braeckman *et al.*, 1999; Braeckman *et al.*, 2002a), waardoor de voorgestelde hypothese dus ondermijnd werd. Houthoofd en collega's (2002b, 2002c) bepaalden de zuurstofconsumptie en de warmteproductie van wormen die gerestricteerd werden door verdunning van de bacteriële voedingsbron in buffer, door een *eat* mutatie of door groei in axenisch medium. Zij constateerden dat CR tegen de verwachtingen in een verhoging van het metabolisme tot gevolg had (indien uitgedrukt per eenheid van lichaamsmassa). Bovendien veroorzaakte CR een verlaging van het ATP gehalte van deze wormen en kon een hogere XTT reductiecapaciteit vastgesteld worden. Een mogelijke verklaring voor deze resultaten is dat de hogere metabole snelheid nodig is voor de synthese van moleculen die vrij beschikbaar

zijn in het dieet van goed gevoede wormen, maar niet of onvoldoende aanwezig zijn in gerestricteerde dieren. Zulke anabole reacties vergen veel energie en reductieve activiteit. Een ander proces dat mogelijk veel energie vereist, is een verhoogde proteïne *turnover*, zoals ook gesuggereerd werd in calorisch gerestricteerde knaagdieren (Lewis *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1999). De snelheid van proteïne *turnover* onder condities van calorische restrictie in *C. elegans* werd echter nog niet onderzocht. Een verhoging van het metabolisme tengevolge van CR in *C. elegans* is in overeenstemming met resultaten in andere organismen. In ratten blijkt het effect van CR op de metabole snelheid afhankelijk te zijn van de lengte van de gerestricteerde periode. Ratten die gedurende een korte periode (enkele weken) onderworpen werden aan CR vertoonden een verlaging van het metabolisme (Gonzales-Pachaco *et al.*, 1993). Indien de ratten echter gedurende een langere periode (enkele maanden of levenslang) gerestricteerd werden, kon geen verlaging van het metabolisme vastgesteld worden (McCarter *et al.*, 1985; McCarter en Palmer, 1992; Lanmbert *et al.*, 2004). Ook in *Drosophila* gingen de levensduurverlengende effecten van CR niet gepaard met een verlaging van de metabole snelheid (Hulbert *et al.*, 2004). Lin en collega's (2002) toonden aan dat CR in de gist *Saccharomyces cerevisiae* een verhoogde respiratie tot gevolg had. Deze shift van fermentatie naar respiratie bleek noodzakelijk en voldoende voor de levensduur-verlengende effecten van CR.

Een alternatieve hypothese die voorgesteld werd, veronderstelt dat de productie van energie in *C. elegans* verloopt via een verschillende flux doorheen twee mogelijke mitochondriale metabole *pathways*: aerobe respiratie en fermentatieve malaat dismutatie. In de laatstgenoemde *pathway* wordt fumaraat ter hoogte van complex II van de elektronentransportketen gereduceerd tot succinaat. De auteurs suggereren dat langlevende *C. elegans* mutanten energie genereren via een verhoogde malaat dismutatie, wat een verminderde productie van ROS met zich zou meebrengen. Dit zou dan leiden tot een verlenging van de levensduur (Rea en Johnson, 2003). Niet-aerobe respiratie levert echter minder energie op en het is dan ook denkbaar dat een substantiële verhoging van deze *pathway* vereist is om het grote verlies aan energie te compenseren dat gepaard gaat met de shift van een oxidatief naar een fermentatief metabolisme (Houthoofd en Vanfleteren, 2006). Bovendien gaat de inductie van fermentatie gepaard met een verhoogde glycolyse, een *pathway* die eveneens een potentiële bron van toxiciteit is. De meeste glycolytische intermediären zijn aldehyden, ketonen en hun afgeleiden. Deze moleculen bezitten reactieve carbonylgroepen en zijn daarom potentieel schadelijk voor andere macromoleculen in de cel (Kikuchi *et al.*, 2003). Er werd dan ook gesuggereerd dat een continue glycolytische activiteit in goed gevoede organismen het verouderingsproces versnelt en dat CR de levensduur verlengt door een verlaging van de metabole flux doorheen de glycolyse (Hipkiss, 2006). Recente bevindingen lijken deze hypothese inderdaad te ondersteunen. Een grootschalig RNAi onderzoek in *C. elegans* toonde aan dat *gpi-1* (glucose-6-fosfaat isomerase) RNAi de wild type levensduur met meer dan 30% kon verlengen (Hansen *et al.*, 2005). Ook fosfoglyceraat mutase RNAi leidde tot een verlenging van de levensduur (Lee *et al.*, 2003). Een gelijkaardige kwalitatieve shift in metabolisme tengevolge van CR werd ook vastgesteld in gist (Lin *et al.*, 2002).

4.3.5.3.2 Verminderde INS/IGF-1 signalisatie

Verschillende waarnemingen in *C. elegans* suggereren dat CR de levensduur zou kunnen verlengen via een reductie van de INS/IGF-1 *pathway*. (1) Eerst en vooral ligt een reductie van deze *pathway* aan de basis van de verlengde levensduur van de dauerlarven en één van de factoren die de vorming van dauers reguleert is de beschikbaarheid van voedsel (Riddle en Albert, 1997). (2) De verlengde levensduur van mutanten met defecten in sensorische perceptie is DAF-16-afhankelijk (Apfeld en Kenyon, 1999). Bovendien komen de meeste insuline-achtige peptiden tot expressie in de sensorische neuronen van de kopregio (Pierce *et al.*, 2001). Deze waarnemingen suggereren dat de insuline *pathway* betrokken is bij de perceptie van voedsel. (3) Zoals eerder beschreven is de darm de plaats waar de opname van nutriënten plaatsvindt. Er werd aangetoond dat INS/IGF-1 activiteit in de darmcellen van *C. elegans* noodzakelijk en voldoende is voor de regulatie van de levensduur (Libina *et al.*, 2003). (4) Wormen waarin de *germline* verwijderd werd door laserablatie zijn langlevend en ook deze levensduurverlenging is DAF-16-afhankelijk. Omdat CR een verminderde fertiliteit tot gevolg heeft, is de proliferatie van de kiemcellen onder deze omstandigheden mogelijk gereduceerd. Bovenstaande waarnemingen lijken te wijzen op een rol voor DAF-2/insuline signalisatie in de regulatie van de levensduur als respons op de beschikbaarheid van voedsel (Houthoofd *et al.*, 2005c).

Verschillende onderzoeksgroepen hebben de rol van INS/IGF-1 signalisatie in de respons op CR onderzocht in *C. elegans*. Johnson en collega's (1990) groeiden de langlevende *age-1* mutant in vloeibare cultuur met verschillende concentraties aan *E. coli* en stelden vast dat de verlengde levensduur van *age-1* verder kon verlengd worden door CR. Dit wijst erop dat de INS/IGF-1 *pathway* niet vereist is voor de effecten van CR op de levensduur. De levensduurverlenging tengevolge van een mutatie in *eat-2* blijkt onafhankelijk te zijn van de insuline *pathway*. *eat-2;daf-2* dubbelmutanten leefden langer dan de individuele mutanten. Bovendien accumuleren *daf-2* mutanten vet in de darm, waardoor ze een zeer donker voorkomen hebben (Kimura *et al.*, 1997). *eat* mutanten zijn daarentegen bleek, wat wijst op een verminderde opstapeling van vetreserves. *eat-2;daf-2* dubbelmutanten hebben een intermediair uitzicht, wat suggereert dat beide genen het metabolisme op een verschillende manier beïnvloeden (Lakowski en Hekimi, 1998). In overeenstemming hiermee stelden Houthoofd en collega's (2004a, 2004b) vast dat axenisch gekweekte *daf-2* mutanten nog steeds een aanzienlijke verlenging van de levensduur vertoonden in vergelijking met wild type dieren. Meissner en collega's (2004) constateerden dat de levensduur van *daf-2* mutanten nog bijkomend kon verlengd worden door een mutatie in *pep-2*. Ook de resistentie tegen warmte en oxidatieve stress werd versterkt door deze additionele mutatie. Dit suggereert dat de *pep-2*-afhankelijke beperking van de beschikbare aminozuren de levensduur controleert parallel aan de DAF-2/insuline *pathway* (Meissner *et al.*, 2004). Voorzichtigheid is echter geboden met de interpretatie van zulke epistase-experimenten, aangezien elke mutatie/interventie afzonderlijk een suboptimaal effect op de levensduur zou kunnen hebben. Zo zijn de langlevende INS/IGF-1 mutanten geen nulmutanten, maar 'reduction-of-function' mutanten, wat impliceert dat ze nog residuele activiteit hebben. Men zou dus kunnen redeneren dat een verdere verlenging van de levensduur van de insuline *pathway* mutanten een gevolg is van een verdere verlaging van de INS/IGF-1 activiteit (Gems *et al.*, 2002).

De studie van *daf-16* mutanten heeft meer uitsluitsel gegeven over de betrokkenheid van de DAF-2/insuline *pathway* in de respons op calorische restrictie. Mutaties in *daf-16* zijn in staat om de verlengde levensduur van de langlevende INS/IGF-1 mutanten volledig te onderdrukken. Indien de verlenging van de levensduur tengevolge van CR gemedieerd zou worden door de INS/IGF-1 *pathway*, zou een mutatie in *daf-16* dus de levensduurverlenging van gerestricteerde wormen moeten kunnen teniet doen (Houthoofd *et al.*, 2005c). Een mutatie in *daf-16* bleek echter niet in staat om de lange levensduur van een *eat-2* mutant te onderdrukken (Lakowski en Hekimi, 1998). Ook de verhoogde stressresistentie van *pep-2* mutanten was onafhankelijk van deze transcriptiefactor (Meissner *et al.*, 2004). Bovendien kon een mutatie in *daf-16* de verlengde levensduur, het verhoogde metabolisme en de toegenomen stressresistentie van wormen die gegroeid werden in axenisch medium niet onderdrukken (Houthoofd *et al.*, 2003a; Houthoofd *et al.*, 2005a). Dit is in overeenstemming met de cytosolische lokalisatie van DAF-16::GFP in *eat-2* mutanten en in wild type wormen die gegroeid werden in axenische cultuur (Henderson en Johnson, 2001; Houthoofd *et al.*, 2003a). Tesaamen tonen deze resultaten duidelijk aan dat calorische restrictie in *C. elegans* geen gevolg is van een verlaagde INS/IGF-1 signalisatie.

4.3.5.3 CR-specifieke transcriptiefactoren

Zeer recent werd een rol vastgesteld voor twee evolutionair geconserveerde transcriptiefactoren in de verlenging van de levensduur onder condities van CR in *C. elegans*. In een systematische RNAi *screen* van de 15 *daf-16* homologen in *C. elegans* werd *pha-4* geïdentificeerd als een regulator van de levensduur in calorisch gerestricteerde wormen (Panowski *et al.*, 2007). Deze transcriptiefactor speelt een essentiële rol bij de ontwikkeling van de farynx tijdens de embryogenese, en is noodzakelijk tijdens de adulte fase voor de respons op CR. *pha-4* RNAi onderdrukte de verlengde levensduur van *eat-2* mutanten en blokkeerde de respons van wild type wormen op de verdunning van de bacteriële voedselbron. De inhibitie van *pha-4* expressie in *daf-2* mutanten of wormen met een verlaagd elektronentransport had geen effect op de levensduur. Dus, *pha-4* is specifiek noodzakelijk voor de levensduurverlenging tengevolge van CR. Bovendien werd aangetoond dat de respons op insuline signalisatie resulteert in de DAF-16-afhankelijke regulatie van *sod-1*, *sod-3* en *sod-5*, terwijl CR de PHA-4-afhankelijke expressie van *sod-1*, *sod-2*, *sod-4* en *sod-5* controleert. Deze resultaten tonen dus nogmaals aan dat er in *C. elegans* een signaaltransductiepad bestaat dat de levensduur reguleert in gerestricteerde wormen, onafhankelijk van de DAF-2/insuline *pathway* (Panowski *et al.*, 2007).

Naar analogie met PHA-4, werd ook voor SKN-1 een rol ontdekt in de respons op CR (Bishop en Guarente, 2007). Deze transcriptiefactor is tijdens de vroege embryogenese noodzakelijk voor de ontwikkeling van de darm en beschermt adulte wormen tegen oxidatieve stress door de inductie van fase II detoxificatiegenen (An en Blackwell, 2003; Inoue *et al.*, 2005). Een verliesmutatie in *skn-1* onderdrukte volledig de respons van wormen op de verdunning van de bacteriële voedselbron. Verschillende isovormen van SKN-1 worden teruggevonden in de darm en de twee ASI neuronen van volwassen wormen. Er werd aangetoond dat enkel het SKN-1 van de ASI neuronen en niet dat van de darm, nodig is voor de respons op CR. Bovendien bleek deze SKN-1 isovorm noodzakelijk voor de verhoogde respiratie die werd

vastgesteld in gerestricteerde wormen. De ASI's zijn neurosensorische cellen die omgevingssignalen integreren en als reactie hierop verscheidene hormonen produceren. De auteurs suggereren dat de cellulaire energetische status van deze neuronen de metabole activiteit van de wormen stimuleert in de perifere weefsels, door de productie van een hormonaal signaal (Bishop en Guarente, 2007).

Tesamen tonen deze resultaten aan dat de respons op CR in *C. elegans* een gevolg is van een actief gereguleerd proces (Antebi, 2007).

4.3.5.3.4 Activering van *sirtuïnes*

Eerder werd reeds vermeld dat de levensduur van *C. elegans* kan verlengd worden door de DAF-16-afhankelijke overexpressie van *sir-2.1* (Tissenbaum en Guarente, 2001). Naast de link tussen *sir-2.1* en DAF-16, werd ook een rol gesuggereerd voor *sir-2.1* in de regulatie van CR. Zo werd beschreven dat de verlengde levensduur tengevolge van CR afhankelijk is van *SIR2* in gist (Lin *et al.*, 2000) en *Drosophila* (Rogina en Helfand, 2004). Resveratrol, een polyfenol dat aanwezig is in rode wijn, vertraagt het verouderingsproces in gist, fruitvliegen en nematoden op een *sir-2*-afhankelijke manier. In gist en *Drosophila* werd geen levensduurverlenging na behandeling met resveratrol waargenomen onder condities van CR. Dit impliceert dus dat resveratrol in deze organismen een toestand teweegbrengt gelijkaardig aan CR (Howitz *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2004). Recent werd echter aangetoond dat de effecten van resveratrol veroorzaakt werden door reactie van resveratrol met het fluorescent substraat dat gebruikt werd in de *in vitro* *sir-2* deacetylase assay en dus niet door de rechtstreekse activering van *sir-2* (Borra *et al.*, 2005; Kaeberlein *et al.*, 2005).

Aangezien de levensduurverlenging tengevolge van *sir-2.1* overexpressie afhankelijk is van DAF-16 (Tissenbaum en Guarente, 2001) en omdat CR in *C. elegans* de levensduur verlengt via een mechanisme dat onafhankelijk is van DAF-16 (Lakowski en Hekimi, 1998; Houthoofd *et al.*, 2003), is het weinig waarschijnlijk dat de activiteit van SIR-2.1 verantwoordelijk is voor de CR-geïnduceerde verlenging van de levensduur. Zeer recent werd de betrokkenheid van SIR-2.1 in de respons op CR in *C. elegans* rechtstreeks getest door verschillende onderzoeksgroepen. Zo werd vastgesteld dat de afwezigheid van voedsel tijdens het adulte stadium de levensduur van een *sir-2.1* mutant kon verlengen (Kaeberlein *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Dit impliceert dat *sir-2.1* niet noodzakelijk is voor de levensduurverlengende effecten van CR. Eén studie toonde aan dat de verlengde levensduur van een *eat-2* mutant volledig onderdrukt werd door een additionele mutatie in *sir-2.1* (Wang en Tissenbaum, 2006). In twee andere studies bleek de verlengde levensduur van een *eat-2* mutant echter onafhankelijk van *sir-2.1* (Kaeberlein *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2007). Ook een directe beperking van de voedselconcentratie zoals voorgesteld door Klass (1977), leidde tot een verlenging van de levensduur in een *sir-2.1* mutant (Hansen *et al.*, 2007). Deze resultaten tonen aan dat *sir-2.1* vermoedelijk geen rol speelt in de respons op CR in *C. elegans*. Het *C. elegans* genoom bevat echter nog drie andere *sir-2* homologen. Het is dus niet volledig uitgesloten dat een ander *sir-2* gen de respons op CR reguleert onafhankelijk van DAF-16.

4.3.5.3.5 Verminderde TOR signalisatie

Een *pathway* die mogelijk wel verantwoordelijk is voor de respons op calorische restrictie in *C. elegans* is signalisatie via TOR (*Target Of Rapamycin*). TOR werd oorspronkelijk geïdentificeerd in *S. cerevisiae*, waar mutaties in de genen *TOR-1* en *TOR-2* resistentie verleenden tegen de groei-inhiberende stof rapamycine (Heitman *et al.*, 1991). Opeenvolgende studies toonden aan dat elk onderzocht eukaryoot genoom een *TOR* gen bevat. In tegenstelling tot gisten, bezitten hogere eukaryoten slechts één enkel *TOR* gen (Wullschlegler *et al.*, 2006). In zoogdieren en *Drosophila* controleert TOR de groei en het metabolisme als reactie op de beschikbare hoeveelheid aan aminozuren in de cel en dit via de regulatie van transcriptie, mRNA translatie en proteïne afbraak. Onder groei-bevorderende condities (veel aminozuren) is zoogdier TOR (mTOR) actief wat resulteert in de fosforylatie van S6K (ribosomaal S6 kinase) en 4E-BP (eukaryoot initiatiefactor 4E-bindend proteïne). S6K wordt op die manier geactiveerd, terwijl 4E-BP, die een repressor is van mRNA translatie, geïnhibeerd wordt. Dit heeft een verhoogde eiwitsynthese tot gevolg. Een tekort aan aminozuren verhindert mTOR signalisatie en leidt tot verhoogde autofagie en afbraak van proteïnen (Hay en Sonenberg, 2004; Wullschlegler *et al.*, 2006).

Een mutatie in *let-363*, het TOR homoloog in *C. elegans*, veroorzaakt een vertraagde ontwikkeling en een groeistop in het L3 stadium. Grote, autofluorescente lysosomale vesikels accumuleren in de darmcellen. Ook daalt het cytoplasmatisch volume van deze cellen sterk, waardoor het lumen van de darm toeneemt (Long *et al.*, 2002). De observatie dat disruptie van de *C. elegans* homologen eIF-4G (onderdeel van een ribosomaal preïnitiatie complex) en eIF-2 (algemene translatie-initiatiefactor) een fenotype veroorzaakte dat grotendeels indentiek was aan het fenotype tengevolge van TOR inactivering, suggereert dat TOR deficiëntie in *C. elegans* een globale inhibitie van mRNA translatie tot gevolg heeft (Long *et al.*, 2002). Deze link tussen TOR en mRNA translatie werd recent verder onderzocht. De uitschakeling van *ife-2* (eIF4E) in *let-363*-deficiënte dieren veroorzaakte een verdere verlenging van de levensduur, wat suggereert dat hun effecten op het verouderingsproces via verschillende mechanismen verloopt (Syntichaki *et al.*, 2007). De observatie dat inhibitie van *let-363* de levensduur van zowel wild type als eIF4G-deficiënte wormen kon verlengen, leidde tot dezelfde conclusie. RNAi inactivering van *let-363* in een *S6K/rks-1* mutant resulteerde echter in een kleine verkorting van de levensduur, wat suggereert dat TOR en S6K de levensduur via eenzelfde mechanisme reguleren (Pan *et al.*, 2007). Samen wijzen deze resultaten op het bestaan van deels verschillende en deels overlappende mechanismen waarmee TOR en mRNA translatie de levensduur in *C. elegans* reguleren.

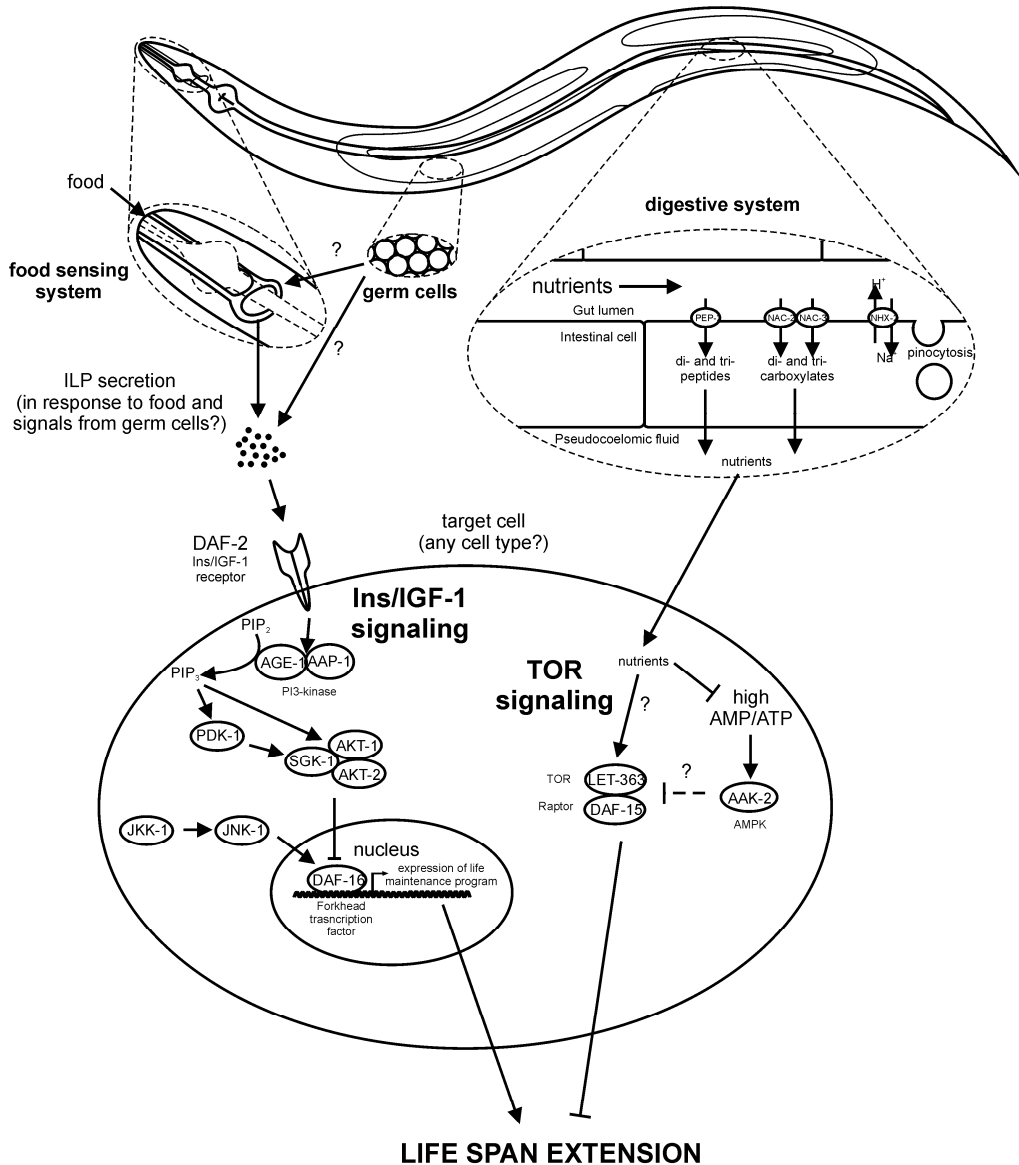
Een mutatie in *daf-15*, het *C. elegans* homoloog van Raptor (*Regulatory associated protein of TOR*), veroorzaakte een fenotype gelijkaardig aan dat van een *let-363* mutant. Bovendien zijn heterozygote *daf-15* mutanten langlevend (Jia *et al.*, 2004). Hoewel een heterozygote *let-363* mutatie geen effect had op de levensduur (Jia *et al.*, 2004), bleek *let-363* RNAi geïnitieerd vanaf het adulte stadium, de hoeveelheid wild type eiwit voldoende te kunnen reduceren om een verlenging van de levensduur te veroorzaken. Deze levensduurverlenging bleek onafhankelijk van DAF-16 (Vellai *et al.*, 2003; Henderson *et al.*, 2006).

Meissner en collega's (2004) toonden vervolgens een mogelijke rol voor TOR signalisatie aan in de respons op calorische restrictie. Een mutatie in *pep-2*, de enige di-en tripeptide

transporter in de darmcellen van *C. elegans*, veroorzaakte een vertraagde ontwikkeling en een verminderde fertiliteit en dit bleek een rechtstreeks gevolg te zijn van de sterk verminderde beschikbaarheid van aminozuren in deze mutant. De combinatie van een *pep-2* mutatie met een zwak *let-363* RNAi construct resulteerde in een significante versterking van het *let-363* RNAi effect op de levensduur. Een mutatie in *pep-2* kon echter de verlengde levensduur van een sterk *let-363* RNAi construct niet intensifiëren. Dit suggereert dat *pep-2* een functie heeft *upstream* van TOR. Dus, de beperkte beschikbaarheid van aminozuren in een *pep-2* mutant beïnvloedt de TOR *pathway* in *C. elegans* (Meissner *et al.*, 2004).

Er is ook toenemend bewijs voor een interactie tussen insuline signalisatie en de TOR *pathway*. In zoogdieren wordt de activiteit van mTOR geïnduceerd door insuline en andere groeifactoren via PI3K en Akt (Oldham en Hafen, 2003; Hay en Sonenberg, 2004; Avruch *et al.*, 2006). RT-PCR in *daf-2* en *daf-2;daf-16* mutanten toonde aan dat de hoeveelheid *daf-15* mRNA lager was in de *daf-2* mutant in vergelijking met de *daf-2;daf-16* mutant. Bijgevolg is geactiveerd (nucleair) DAF-16 een inhibitor van *daf-15* expressie. Dit werd bevestigd via een DAF-15::GFP reporter construct. Behandeling van de wormen met *daf-16* RNAi versterkte de GFP-fluorescentie (Jia *et al.*, 2004). Bovendien werd via *microarray* analyse aangetoond dat DAF-16 ook de transcriptie van *pep-2* inhibeert (Murphy *et al.*, 2003). Dus, de insuline *pathway* en TOR signalisatie lijken samen te werken in een complex regulatorisch circuit, dat metabolisme en levensduur optimaliseert in functie van de beschikbare hoeveelheid nutriënten (Hamilton *et al.*, 2005; Houthoofd *et al.*, 2007) (Fig. 4.10).

Verschillende onderzoeksgroepen onderzochten zeer recent de rol van TOR signalisatie in de respons op CR door *eat-2* mutanten te onderwerpen aan *let-363* RNAi. Henderson en collega's (2006) stelden vast dat inhibitie van *let-363* de levensduur van een *eat-2* mutant verder kon verlengen. Het is echter onduidelijk wat hiervan de significantie is, aangezien de *eat-2* wormen niet langer leefden dan wild type dieren. In een andere studie werd in elk van zes verschillende experimenten vastgesteld dat *let-363* RNAi geen verdere verlenging van de lange levensduur van *eat-2* mutanten tot gevolg had (Hansen *et al.*, 2007). Dus, in *C. elegans*, net als in gist en fruitvliegen (Kapahi *et al.*, 2004; Kaeberlein *et al.*, 2005), zou CR de levensduur kunnen verlengen door de signalisatie via TOR te inhiberen. Hansen en collega's (2007) onderzochten ook de snelheid van mRNA translatie in *eat-2* mutanten en *let-363* RNAi dieren. Zij constateerden dat het translatieproces vertraagd was in deze wormen. Ondanks het feit dat *let-363* RNAi geen verdere verlenging van de levensduur in een *eat-2* mutant tot gevolg had, veroorzaakte de inhibitie van dit gen toch een verdere reductie van de eiwitsynthese in een *eat-2(-)* achtergrond. Omdat de inhibitie van het translatieproces door RNAi inactivering van ribosomale proteïnen en S6K wel een verlengde levensduur veroorzaakte in *eat-2* mutanten, werd gesuggereerd dat TOR RNAi een tweede *output* heeft die verhindert dat de verdere reductie van translatie een verdere verlenging van de levensduur tot gevolg heeft (Hansen *et al.*, 2007). Tot op heden blijft de exacte relatie tussen calorische restrictie en TOR signalisatie dus nog onduidelijk.



Figuur 4.10: Schematisch overzicht dat de mogelijke betrokkenheid van de TOR en insuline/IGF-1 *pathway* beschrijft bij de regulatie van de levensduur tengevolge van de beschikbaarheid aan nutriënten in *C. elegans*. Voedsel wordt gedetecteerd door de amfiden. Specifieke neuronen in deze regio produceren insuline-achtige peptiden die de activiteit van de DAF-2/insuline *pathway* moduleren. Ook signalen afkomstig van het reproductieve systeem beïnvloeden de levensduur via dit signaaltransductiepad. Nutriënten worden opgenomen door de darmcellen via specifieke transporters of via pinocytose en getransporteerd naar de pseudocoel. Cellen nemen vervolgens deze nutriënten op via alsnog onbekende mechanismen (Houthoofd *et al.*, 2007).

4.3.5.3.6 AAK-2 activering

Recent werd een rol voor AMPK (*AMP-activated protein kinase*) gesuggereerd in de respons op calorische restrictie in *C. elegans*. In zoogdieren leidt de activering van AMPK tot een verminderde mTOR activiteit en bijgevolg een gereduceerde fosforylatie en inhibitie van S6K (Kimura *et al.*, 2003). Het *C. elegans* genoom bevat twee AMPK homologen, *aak-1* en *aak-2*. Zoals eerder vermeld, resulteert de activering van *aak-2* tengevolge van een verhoogde AMP/ATP ratio in een verlengde levensduur (Apfeld *et al.*, 2004). Omdat het logisch lijkt dat CR gepaard gaat met een verhoging van deze ratio, zou de inductie van *aak-2* verantwoordelijk kunnen zijn voor de levensduurverlenging tengevolge van CR (Houthoofd *et al.*, 2005). Recent werd deze hypothese getest door het effect van een *aak-2* mutatie op de verlengde levensduur van een *eat-2* mutant na te gaan. De mutatie in *aak-2* had echter geen effect op de levensduur van de *eat-2* mutant en dus is *aak-2* niet vereist voor de levensduurverlenging tengevolge van CR. Dit suggereert dat additionele, tot op heden niet-geïdentificeerde, *pathways* betrokken zijn bij de regulatie van de levensduur in *C. elegans* (Curtis *et al.*, 2006).

5 Veroudering is evolutief geconserveerd

Naast *C. elegans* (zie Hoofdstuk 4) worden verschillende andere modelorganismen gebruikt om de biologie van het verouderingsproces te bestuderen. Ook de studie van veroudering in onder meer de gist *Saccharomyces cerevisiae*, de schimmel *Podospora anserina*, de fruitvlieg *Drosophila melanogaster* en de muis *Mus musculus* leidde tot grote vooruitgang in het verwerven van inzichten in het verouderingsproces. Zo liet de analyse van een groot aantal mutanten toe verschillende genen en signaaltransductiepaden te identificeren die betrokken zijn bij het verouderingsproces. Als we de oorzaak van veroudering in de mens willen bestuderen aan de hand van modelorganismen, is het echter belangrijk dat de moleculaire basis van veroudering evolutief geconserveerd is. Verschillende observaties suggereren dat dit inderdaad het geval is. Niet alleen worden er fenotypische overeenkomsten waargenomen tussen evolutief divergente organismen (exponentiële toename van de mortaliteit met toenemende leeftijd, verminderde metabole capaciteit, accumulatie van oxidatieve schade), ook blijken dezelfde mechanismen veroudering te kunnen vertragen in tal van organismen. Calorische restrictie, de vermindering van de beschikbare hoeveelheid voedsel zonder ondervoeding, veroorzaakt bovendien in al deze modelsystemen een verlenging van de levensduur.

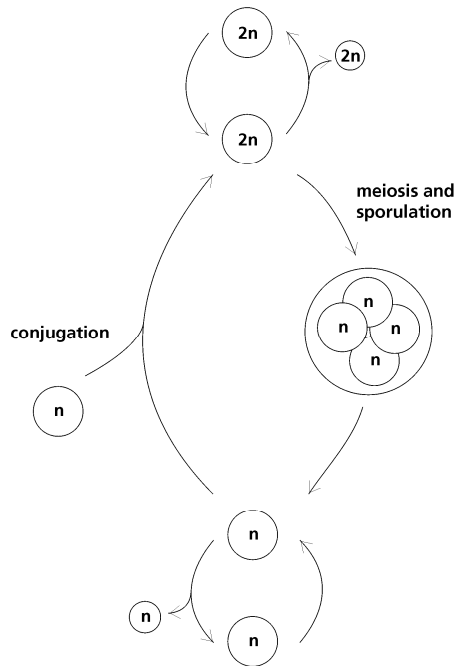
In dit hoofdstuk wordt eerst een korte beschrijving gegeven van een aantal veel gebruikte modelsystemen in het onderzoek naar veroudering en calorische restrictie. Er wordt ook beschreven hoe CR in deze organismen wordt toegepast. Vervolgens wordt de betrokkenheid van de insuline/IGF-1 *pathway*, de sirtuïnes, de TOR *pathway* en de mitochondriën bij de regulatie van de levensduur van de verschillende modelsystemen besproken. Daarbij wordt eveneens nagegaan of deze mechanismen van veroudering een rol spelen bij de respons op CR.

5.1 Overzicht van veel gebruikte modelorganismen

5.1.1 Gist

De bakkersgist *Saccharomyces cerevisiae* is een knopvormende gist die voorkomt als haploïd en als diploïd organisme dat zich zowel sexueel als asexueel kan voortplanten (Fig. 5.1). Bij sexuele voortplanting versmelten twee haploïde cellen van verschillend *mating* type. De twee *mating* types (a en α) ontstaan door *cassette switching* ter hoogte van de MAT (*Mating Type*) locus. De a en α genen bevinden zich op verschillende plaatsen in het genoom (HMR regio voor de a genen en HML regio voor de α genen), waar de transcriptie van deze genen geïnhibeed wordt door het SIR (*Silent Information Regulation*) complex, dat in gist ook een rol speelt bij de *silencing* van genen ter hoogte van de telomeren en het herstellen van DNA breuken (Guarente, 1999). *Cassette switching* treedt op wanneer een replica van een gerepresseerd a of α gen de aanwezige informatie ter hoogte van de MAT locus vervangt, met de expressie van dit gen tot gevolg. Dit proces veroorzaakt de expressie

van verschillende genen die uiteindelijk het geslacht van de cel bepalen. In een diploïde cel worden beide genproducten tot expressie gebracht, zodat deze steriel is. Een diploïde cel kan onder ongunstige omstandigheden aanleiding geven tot de vorming van vier haploïde sporen via meïose. Bij asexuele voortplanting ontstaat een dochtercel vanuit de moedercel door de vorming van een knop op het lichaam. Deze dochtercel wordt vervolgens afgescheiden waarna een chitine litteken op de moedercel achterblijft. De mogelijkheid om celdelingen te ondergaan is eindig. De replicatieve levensduur van een moedercel wordt gedefinieerd als het aantal dochtercellen dat ze kan produceren. Na de vorming van 20 à 30 dochtercellen wordt de moedercel postreproductief (Mortimer en Johnston, 1959; Jazwinski, 1993).



Figuur 5.1: De levenscyclus van *S. cerevisiae*.

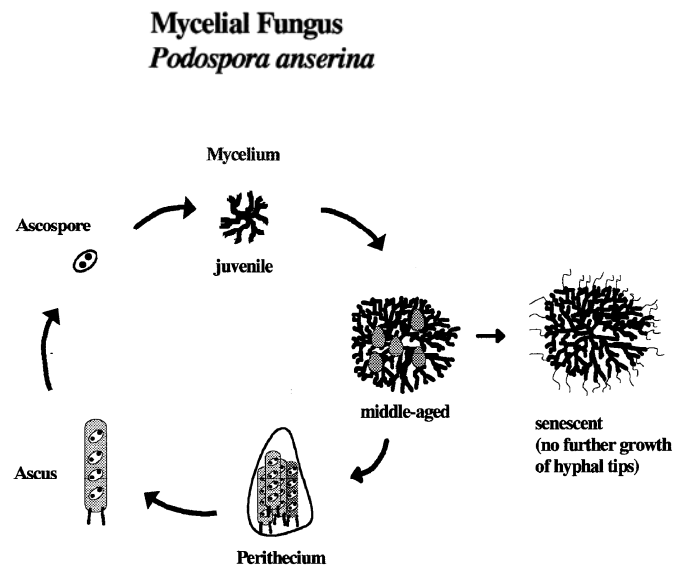
De chronologische leeftijd van een gistcel is de tijd die een postreproductieve, stationaire fase populatie kan doorbrengen in vloeibare cultuur, vooraleer te sterven door lyse. *S. cerevisiae* kan bijgevolg op twee verschillende manieren gebruikt worden als een model voor de veroudering van multicellulaire eukaryoten. Replicatieve veroudering in gist is een model voor de veroudering van mitotisch actieve zoogdiercellen, terwijl chronologische veroudering in gist geschikt is als model voor de veroudering van postmitotische cellen (Longo, 1999).

In tegenstelling tot de metazoa is er bij *S. cerevisiae* geen scheiding tussen soma en germline. Wegens de asymmetrische deling van de moedercellen treedt er echter toch veroudering op in deze cellen, die o.a. door hun grootte van de dochters kunnen onderscheiden worden (Jazwinski, 1993).

Gistcellen kunnen onderworpen worden aan CR door de hoeveelheid glucose in het groeimedium te verminderen. Dit resulteert in een stijgende generatietijd en een verlenging van de replicatieve levensduur van wild type gistcellen. De verlengde levensduur is in verhouding met de reductie aan beschikbare nutriënten (Jiang *et al.*, 2000). CR kan ook gemodelleerd worden door mutaties in componenten van de cAMP-afhankelijke proteïne kinase A (PKA) *pathway* (Lin *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002), een signalisatiecascade die noodzakelijk is voor het gebruik van glucose als brandstof. Ook een vermindering van de aminozuur concentratie in het kweekmedium veroorzaakt een verlenging van de levensduur in gist, wat suggereert dat het niet de verminderde beschikbaarheid van een bepaalde voedingscomponent in het medium is, maar eerder de verlaging van de calorische waarde van het medium die een rol speelt in de verlenging van de levensduur (Jiang *et al.*, 2000). Of een verminderde hoeveelheid aan calorieën effectief aan de basis ligt van de verlengde levensduur is hiermee echter niet bewezen (Jazwinski, 2002b).

5.1.2 Schimmel

Filamenteuze schimmels worden gekenmerkt door de ontwikkeling van een mycelium dat bestaat uit filamenteuze cellen die hyfen genoemd worden. De overgrote meerderheid van de filamenteuze schimmels is onsterfelijk, omdat ze zich vegetatief voortplanten door radiale groei aan de periferie van het mycelium. Er zijn echter een aantal uitzonderingen. Zo werd in de vroege jaren 1950 voor het eerst beschreven dat *Podospora anserina*, in tegenstelling tot de meeste andere filamenteuze schimmels, een eindige, stam-specifieke levensduur heeft (Rizet, 1953). Afhankelijk van de stam en de kweekcondities kan *P. anserina* gedurende enkele weken tot enkele maanden overleven. De niet-groeiende delen van een mycelium kunnen zich seksueel voortplanten via de vorming van ascosporen, die opnieuw kunnen uitgroeien tot een mycelium (Fig. 5.2). De wild type stam *s* wordt bv. gekenmerkt door een gemiddelde levensduur van 25 dagen bij 27°C. Indien de cultuur geïnitieerd wordt vanaf een gekiemde ascospore, zal deze wild type stam groeien met een snelheid van 7 mm per dag tot aan het begin van de verouderingsfase. Veroudering gaat in *P. anserina* gepaard met een progressieve vertraging van de groei-snelheid, een verminderde vorming van luchthyfen en een toenemende pigmentatie van het mycelium die het gevolg is van de accumulatie van lipofuscine (Munkres en Rana, 1978). Tenslotte stopt de cultuur volledig met groeien en sterven de hyfen ter hoogte van het groeifront af. De uiteinden van de hyfen van verouderende culturen barsten ook regelmatig open (Arking, 1998; Osiewacz, 2002).



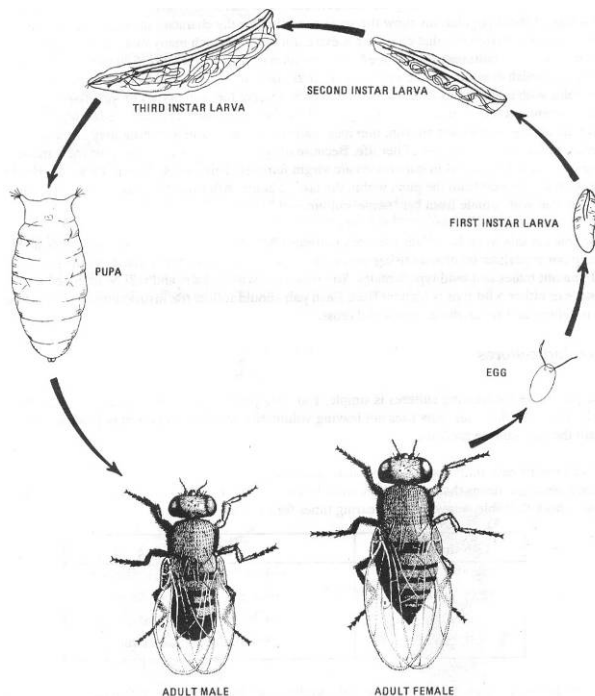
Figuur 5.2: De levenscyclus van *P. anserina*.

P. anserina kan onderworpen worden aan CR door de concentratie aan glucose in het kweekmedium te verlagen. Schimmels die gegroeid worden op agarplaten met 100 maal minder glucose groeien sneller, maar minder compact, zijn slechts weinig gekleurd, reproduceren trager en hebben een verlengde levensduur. De respons op CR varieert echter van geen effect tot een 5-voudige verlenging van de levensduur (Maas *et al.*, 2004). Deze variatie blijkt gecorreleerd te zijn met de aan- of afwezigheid van een pAL2-1 homologe plasmide. Plasmide-vrije schimmels vertonen een sterke respons op CR, terwijl schimmels die het plasmide bevatten vrijwel ongevoelig zijn voor CR (Maas *et al.*, 2004). pAL2-1 homologen zijn lineaire mitochondriale plasmiden die functioneren als mutators door te integreren in de rDNA regio van het mitochondriale genoom, waar ze interfereren met de functie van de

mitochondriën (Maas *et al.*, 2007). Of het effect van de geïntegreerde plasmiden op de respons op CR eenvoudigweg een gevolg is van een mechanisme dat onafhankelijk is van 'normale' veroudering of van een mechanisme dat in verband staat met een specifieke *host* respons (die bv. de kans op integratie verhoogt), is nog niet duidelijk. Omdat deze plasmide-afhankelijke veroudering in *P. anserina* echter overeenkomsten vertoont met dit proces in *Neurospora*, concluderen de auteurs dat plasmide-afhankelijke veroudering in *P. anserina* het best beschouwd wordt als een lethale pathologie, die verschillend is van echte veroudering (Maas *et al.*, 2004; Maas *et al.*, 2007).

5.1.3 Fruitvliegen

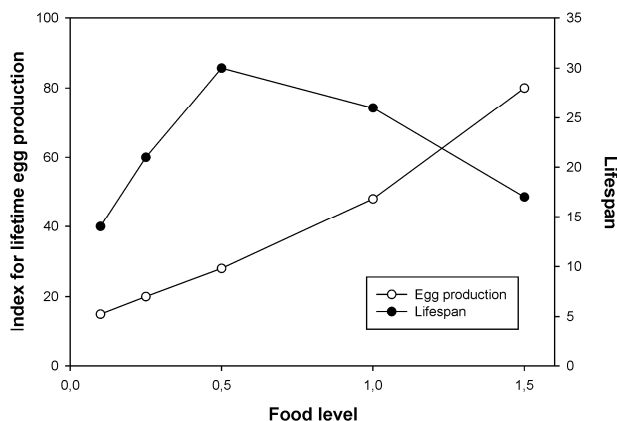
De levenscyclus van de fruitvlieg *Drosophila melanogaster* is weergegeven in Fig. 5.3. Na de embryogenese sluipt de L1 larve uit het ei, gevolgd door twee opeenvolgende vervellingen tot de respectievelijke L2 en L3 stadia. Na de verpopping van de L3 larve wordt de ontwikkeling vervolledigd en zal een volwassen vlieg uitsluipen. De volledige cyclus neemt ongeveer tien dagen in beslag bij 25°C. Adulte vliegen leven gemiddeld 40 à 60 dagen. Met uitzondering van de voortplantingscellen zijn de meeste weefsels van *D. melanogaster* postmitotisch (Finch, 1990). Veroudering gaat in de fruitvlieg o.a. gepaard met een verminderde reproductieve capaciteit, verhoogde weefselschade, verminderde activiteit, een stijging van het lipofuscine gehalte en oxidatieve schade, en een verminderde vliegcapaciteit (Miquel *et al.*, 1976; Finch, 1990; Sohal *et al.*, 1995). *Drosophila* kan



Figuur 5.3: De levenscyclus van *D. melanogaster*.

overwinteren in een diapause stadium dat geïnduceerd wordt door een verlaging van de temperatuur en een verkorting van de fotoperiode. In tegenstelling tot *C. elegans* gaat het hier om een reproductieve diapause in een volwassen organisme. Reproductieve diapause wordt onder meer gekenmerkt door een verhoogde energie reserve, een verlaging van het metabolisme, de gereduceerde productie van juveniel hormoon en een toegenomen stressresistentie (Goto *et al.*, 1998; Tatar en Yin, 2001). Omdat de mortaliteit van post-diapause vliegen niet te onderscheiden is van de mortaliteit van controle vliegen die geen diapause ondergingen, werd aangenomen dat er weinig of geen veroudering optreedt tijdens reproductieve diapause (Tatar en Yin, 2001).

In het laboratorium wordt *D. melanogaster* gekweekt op een medium dat bestaat uit verschillende nutriënten, opgelost in een agar gel. Hoewel de precieze samenstelling van het medium aanzienlijk kan variëren tussen verschillende laboratoria, bevat het gewoonlijk suiker, dode (gedroogde) gistcellen en maïsmeel. Soms wordt ook extra levende gist op de voedingsbodems gebracht (Partridge *et al.*, 2005). Fruitvliegen kunnen op verschillende manieren onderworpen worden aan CR. Enerzijds kan de beschikbaarheid van levende gist beperkt worden (Chippindale *et al.*, 1993). Anderzijds kunnen de nutriënten in het medium verdund worden (Chapman en Partridge, 1996; Mair *et al.*, 2003; Magwere *et al.*, 2004). In beide gevallen wordt een verlenging van de gemiddelde en maximale levensduur waargenomen. Wanneer *Drosophila* blootgesteld wordt aan een scala aan voedselconcentraties zal de levensduur een maximum bereiken bij een intermediaire voedselconcentratie (Fig. 5.4). Een sterkere verdunning van de nutriënten veroorzaakt een verkorting van de levensduur door uithongering. Bij hogere voedselconcentraties veroorzaakt een verhoogde paringsfrequentie eveneens een gereduceerde levensduur (Chapman en Partridge, 1996). In tegenstelling tot het effect van de voedselconcentratie op de levensduur, neemt de fertiliteit van vrouwtjes toe met toenemende concentratie aan nutriënten (Fig. 5.4). Bijgevolg is de voedselconcentratie die optimaal is voor een verlengde levensduur lager dan deze die optimaal is voor het maximaliseren van het aantal nakomelingen. Dit suggereert dat CR meer doet in de vliegen dan enkel het effect van pathologisch 'over-eten' teniet te doen (Chapman en Partridge, 1996).



Figuur 5.4: Fertiliteit en levensduur van *D. melanogaster* in functie van de voedselconcentratie (Chapman en Partridge, 1996).

In een recente studie werd onderzocht of de levensduur in *D. melanogaster* al dan niet afhankelijk is van het aantal calorieën in het opgenomen voedsel (Mair *et al.*, 2005). Vliegen die gekweekt werden op media met verschillende verhoudingen aan suiker en gist, maar met een gelijke calorische inhoud bleken toch een verschillende levensduur te hebben. Dit suggereert dat de samenstelling van het medium de verlenging van de levensduur tengevolge van CR bepaalt. Indien de calorische inhoud van het medium verlaagd werd door de concentratie aan gist te verminderen, werd een veel grotere levensduurverlenging vastgesteld dan wanneer het aantal calorieën in het medium in dezelfde mate verminderd werd door een verlaging van de concentratie suiker. Dit toont aan dat proteïnen en vetten een grotere impact hebben op de levensduur van *D. melanogaster* dan carbohydraten (Mair *et al.*, 2005). Eerder werd echter gesuggereerd dat gerestricteerde vliegen hun voedingspatroon zouden kunnen aanpassen, waardoor zij compenseren voor het verlies aan

calorieën (Cooper *et al.*, 2004). In hun studie stelden Mair en collega's (2005) vast dat gerestricteerde vliegen niet meer tijd spendeerden aan hun voeding. De directe bepaling van de hoeveelheid opgenomen voedsel gaf echter aanleiding tot tegenstrijdige resultaten. In de ene studie werd een verhoogde voedselopname waargenomen met een toenemende verdunning van zowel gist als suiker in het dieet (Carvalho *et al.*, 2005). In de andere studie werd meer voedsel geconsumeerd in de *ad libitum* conditie (Min en Tatar, 2006). Min en collega's (2007) herhaalden recent het experiment van Mair en collega's (2005), maar koppelden nu de levensduur rechtstreeks aan de verbruikte calorieën. Zij stelden vast dat vrouwelijke vliegen op een gist-arm dieet slechts de helft van het aantal calorieën verbruikten dan vliegen op een gist-rijk dieet. Bovendien hadden deze vliegen een verlengde levensduur. Omdat gistcellen ook samengesteld zijn uit verschillende componenten, zoals cabohydraten, sterolen, vetzuren, vitaminen, mineralen en aminozuren, die op hun beurt bepalend kunnen zijn voor de effecten van CR, stellen de auteurs dat het voorbarig is om conclusies te trekken over de rol van calorieën in de verlenging van de levensduur tengevolge van CR (Min *et al.*, 2007).

5.1.4 Knaagdieren, apen en de mens

5.1.4.1 Studies in celculturen

De introductie van celculturen en moleculair biologische technieken verschaftte de onderzoekswereld nieuwe instrumenten voor de studie van veroudering op het moleculaire niveau. Omwille van zijn eenvoud in vergelijking met *in vivo* studies, werd dan ook een aanzienlijk deel van het verouderingsonderzoek in vertebraten uitgevoerd in celcultuur. Reeds in het begin van de twintigste eeuw werd gerapporteerd dat cellen in cultuur konden gekweekt worden. In de vroege jaren 1960 werd vervolgens ondubbelzinnig aangetoond dat normale menselijke fibroblasten *in vitro* een beperkte delingscapaciteit hebben. Na 50 à 70 celdelingen, aangeduidt als de Hayflick-limiet, stoppen de cellen met delen en wordt een verouderingsprogramma geactiveerd. Dit fenomeen wordt replicatieve senescentie genoemd (Hayflick en Moorhead, 1961). De Hayflick-limiet bleek redelijk goed gecorreleerd te zijn met de levensduur van het organisme waarvan de cellen afkomstig waren (geciteerd in Hayflick, 2003). Deze studies met verschillende celtypes suggereerden dat replicatieve veroudering kon gebruikt worden als model voor het onderzoek naar de moleculaire veranderingen in verouderende cellen (Knapowski *et al.*, 2002). Tot op heden kon echter geen oorzakelijk verband vastgesteld worden tussen cellulaire senescentie *in vitro* en menselijke veroudering *in vivo* (zie ook Hoofdstuk 3.2.2). Het meest waarschijnlijke scenario is dan ook dat cellulaire senescentie geëvolueerd is als een verdedigingsmechanisme tegen kanker (de Magalhães, 2004; Zhang, 2007). In overeenstemming hiermee kon in recente *in vivo* studies cellulaire senescentie geobserveerd worden in de vroege stadia van kwaadaardige tumoren (Chen *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005).

Enkele jaren geleden werd een methode beschreven die onderzoek naar de effecten van CR in celcultuur mogelijk maakte (de Cabo *et al.*, 2003). Bepaalde cellulaire reacties tengevolge van CR, zoals een vertraagde groei en een verhoogde stressresistentie, werden *in vitro* gereproduceerd door cellen te kweken in serum afkomstig van gerespecteerde ratten en apen. Deze techniek opende niet alleen perspectieven voor de studie van de mechanismen die aan de basis liggen van CR. Het zou ook dienst kunnen doen als *high throughput screen* voor de identificatie van CR *mimetics* (de Cabo *et al.*, 2003; Lane *et al.*, 2004).

5.1.4.2 Kenmerken van veroudering in zoogdieren

Zoogdieren hebben over het algemeen een zeer gelijkaardig fenotype van veroudering. Alle zoogdieren zijn iteropaar (d.w.z. dat ze zich meerdere malen kunnen voortplanten), vertonen een graduele toename in de snelheid van sterven kort na het bereiken van de puberteit en ondervinden last van ouderdomsverschijnselen in een veelheid aan organen. In tegenstelling tot andere dieren uit verschillende fyta, vertonen zoogdieren ook reproductieve senescentie (Finch, 1990). Typische kenmerken van veroudering bij de mens zijn een graduele achteruitgang van het gehoor en het zicht, een verstoring van de hormonale balansen, een verminderde spiermassa, botontkalking, een verlies van het geheugen, vetopstapeling en een verminderde functie van het immuunsysteem (Cutler en Mattson, 2006; Holliday, 2006). Frequent voorkomende ouderdomsgerelateerde ziekten zijn aderverkalking, hart- en vaatziekten, kanker, Alzheimer en diabetes (Cutler en Mattson, 2006). De ouderdomsgerelateerde ziekten van muizen, en van eender welk bestudeerd zoogdier, zijn grotendeels gelijk aan deze van de mens (Finch, 1990).

Gezien de bezwaren tegen experimenten met mensen, werden inzichten in het menselijke verouderingsproces voornamelijk bekomen via de studie van ééneiige tweelingen, individuen met zeldzame progeria's (Martin en Oshima, 2000) en honderdjarigen (Salvioli *et al.*, 2006), aangezien deze laatsten het beste voorbeeld vormen van succesvolle veroudering. Personen met segmentale progeria syndromen vertonen tekenen van versnelde veroudering. Omdat deze syndromen meer dan één van de typische kenmerken van normale veroudering versnellen, worden ze segmentaal genoemd (in tegenstelling tot unimodale progeria syndromen, zoals Alzheimer, die slechts één weefsel aantasten). De meeste segmentale progeria syndromen worden veroorzaakt door mutaties in genen die betrokken zijn bij het behoud van het genoom, zoals replicatie, transcriptie en herstel van schade. Dit benadrukt het belang van DNA transacties bij het behoud van de soma tijdens veroudering. Voorbeelden van segmentale progeria syndromen zijn het Werner syndroom en het Hutchinson-Gilford syndroom. Het Werner syndroom wordt gekenmerkt door het vroegtijdig voorkomen van ouderdomsverschijnselen (beginnende tijdens de adolescentie) met een kleine gestalte, rimpels, kaalheid, cataract, degeneratie van de spieren en diabetes tot gevolg op de leeftijd van 30 à 40 jaar. Bij het Hutchinson-Gilford syndroom zijn de eerste ouderdomsverschijnselen al zichtbaar tijdens de kindertijd. Naast haaruitval en rimpels behoort ook vroegtijdige aderverkalking tot één van de typische kenmerken van dit syndroom.

Microarray analyse van het verouderingsproces toonde aan dat veroudering in muizen en rhesus apen niet gepaard gaat met grote veranderingen in het expressieniveau van genen. Slechts 2% van de onderzochte genen werd in functie van de leeftijd geïnduceerd of geïnhibeerd in de muis (Lee *et al.*, 2000). Bij rhesus apen vertoonde 6% van de onderzochte genen een veranderd expresiepatroon tijdens veroudering (Kayo *et al.*, 2001). De resultaten van *microarray* studies die de leeftijd-geassocieerde veranderingen in genexpressieniveau onderzochten in de skeletspieren van muizen (Lee *et al.*, 1999), ratten (Sreekumar *et al.*, 2002), apen (Kayo *et al.*, 2001) en mensen (Welle *et al.*, 2003; Welle *et al.*, 2004) tonen aan dat de expressie van genen betrokken bij de respons op stress en ontsteking toeneemt tijdens veroudering, terwijl de expressie van metabole en biosynthetische genen daalt met toenemende leeftijd. Studies met muizen (voor een overzicht zie: Park en Prolla, 2005) en de mens (Zahn *et al.*, 2006) tonen ook aan dat de veranderingen in expressieniveau die gepaard gaan met veroudering verschillend kunnen zijn in verschillende weefsels.

5.1.4.3 CR in knaagdieren

Zoals eerder vermeld, werden de 'anti-verouderingseffecten' van CR voor het eerst vastgesteld in ratten (McCay *et al.*, 1935). Gerestricteerde ratten leefden 33% langer dan de goed gevoede controles en vertoonden minder ouderdomsgerelateerde pathologieën. De diëten die gebruikt werden bij deze initiële experimenten waren tot op zekere hoogte vergelijkbaar met de hedendaagse diëten, omdat ze ook caseïne, zetmeel, cellulose, sucrose en zouten bevatten. Daarnaast bevatten deze diëten echter ook een aantal niet-gezuiverde componenten zoals reuzel, gedroogde gist en visolie. Tegenwoordig worden knaagdieren in het laboratorium gevoed met commercieel gezuiverde diëten die aangerijkt worden met vitaminen en mineralen om deficiënties te voorkomen (Pugh *et al.*, 1999a). Aangezien *ad libitum* gevoede dieren de neiging hebben om zich te overeten, met overgewicht en pathofysiologische afwijkingen als gevolg, worden controle dieren dikwijls ook onder gecontroleerde omstandigheden gevoed (Keenan *et al.*, 1998). In tegenstelling tot *Drosophila*, waar CR toegepast wordt door de kwaliteit (samenstelling) van het voedsel te verlagen terwijl het voedsel zelf in overmaat aanwezig blijft, worden knaagdieren voorzien van een vastgelegde hoeveelheid voedsel met een gereduceerde calorische inhoud. Dit heeft het voordeel dat de hoeveelheid geconsumeerd voedsel precies gekend is. Gerestricteerde dieren consumeren gewoonlijk 30 à 50% minder calorieën dan controle dieren (Weindruch, 1996).

Initieel werd aangenomen dat de gereduceerde opname van calorieën bepalend is voor de levensduur van knaagdieren, ongeacht de bron van deze calorieën (bv. carbohydrates, proteïnen of vetten). Ratten die gevoed werden met isocalorische diëten waarin ofwel de hoeveelheid vetten, ofwel de hoeveelheid mineralen verminderd werd, hadden geen verschillende levensduur (Iwasaki *et al.*, 1988b). Ook bleek een verminderde opname van eiwitten niet aan de basis te liggen van de vertraagde aanzet van een leeftijdsgeassocieerde nierafwijking, aangezien de ontwikkeling van deze ziekte ook vertraagd werd door een verminderde voedselopname zonder reductie van de hoeveelheid proteïnen. De auteurs concludeerden daaruit dat de verminderde calorische waarde van de gerestricteerde

voeding verantwoordelijk was voor de vertraagde ontwikkeling van deze nierziekte (Masoro *et al.*, 1989). In andere experimenten werd echter wel een verlenging van de levensduur geobserveerd in ratten die gevoed werden met isocalorische diëten die een veranderde samenstelling (Dalderup en Visser, 1969; Iwasaki *et al.*, 1988a), of een gereduceerde proteïne concentratie hadden (Yu *et al.*, 1985). Ook het verminderen van het aminozuur methionine in een isocalorisch dieet, veroorzaakte een verlengde levensduur in ratten (Orentreich *et al.*, 1993; Zimmerman *et al.*, 2003). Het is dus ook in knaagdieren nog geen uitgemaakte zaak of de beperking van het aantal calorieën in het dieet noodzakelijk en voldoende is voor het reduceren van ouderdomsgerelateerde ziekten en het verlengen van de levensduur.

5.1.4.4 CR in apen en de mens

Aangezien CR een verlenging van de levensduur veroorzaakt in een zeer grote variëteit aan organismen, rees de vraag of deze interventie ook de levensduur van de mens zou kunnen verlengen. Gezien de ethische en methodologische problemen/bezwaren die experimenten op mensen met zich meebrengen, werd op het einde van de jaren 1980 een aantal studies gestart die als doel hadden het effect van CR op de gezondheid en de levensduur van rhesus apen na te gaan (Roth *et al.*, 2004). Zowel de morfologie als de fysiologie, het gedrag en het profiel van veroudering in deze dieren vertonen namelijk aanzienlijke overeenkomsten met veroudering in de mens. Eén van de voordelen van het gebruik van apen is bovendien dat zij een kortere levensduur hebben dan de mens. Een rhesus aap leeft gemiddeld 25 jaar en heeft een maximale levensduur van ongeveer 40 jaar (Bodkin *et al.*, 2003). De gerespecteerde apen krijgen een dieet dat 30% minder calorieën bevat dan dat van de goed gevoede dieren. Dit dieet bevat weinig vetten en proteïnen, veel vezels en extra vitaminen en mineralen (Ingram *et al.*, 1990; Ramsey *et al.*, 2000). De eerste resultaten van deze studies tonen aan dat gerespecteerde apen in betere gezondheid verkeren dan goed gevoede dieren van dezelfde leeftijd. Zo hebben gerespecteerde apen o.a. een gereduceerd gewicht en tot 70% minder lichaamsvet, hebben ze een verhoogde insuline gevoeligheid en suggereren de lipide profielen in hun bloed een verminderd risico op hart-en vaatziekten (Ramsey *et al.*, 2000; Mattison *et al.*, 2003). Ook beschermt CR de apen tegen de ontwikkeling van ouderdomsdiabetes (Anderson en Weindruch, 2006). Of CR in rhesus apen ook een verlenging van de levensduur zal veroorzaken is nog onduidelijk. De meerderheid van de apen in de verschillende studies hebben nu ongeveer de gemiddelde levensduur van de soort in gevangenschap bereikt. Preliminair resultaten suggereerden dat de overlevingskansen voor de gerespecteerde apen hoger waren dan voor de goed gevoede dieren. Recentere overlevingsgegevens wijzen echter niet meteen op een verlengde levensduur tengevolge van CR in apen. Het zal vermoedelijk nog 10 à 20 jaar duren vooraleer hier definitief uitsluitsel over komt (Ingram *et al.*, 2006; Weindruch, 2006).

De waarnemingen van een beperkt aantal studies (veelal met personen die zich vrijwillig onderwerpen aan CR) suggereren ook een positieve invloed van CR op de gezondheid van de mens (voor een overzicht: zie Heilbronn en Ravussin, 2003; Willcox *et al.*, 2006). Zo werd vastgesteld dat de bevolking van het Japanse eiland Okinawa kenmerken van CR vertoont.

Het traditionele dieet van Okinawa bestaat voornamelijk uit groene bladgroenten, wortels, zoete aardappelen, sojascheuten en kleine hoeveelheden vis en vlees. Onderzoek heeft uitgewezen dat dit dieet voorziet in alle noodzakelijke nutriënten en daarenboven een hoog gehalte aan antioxidantia bevat (Sho, 2001). Er werd vastgesteld dat de populatie van Okinawa slechts 62% van het aantal calorieën consumeert dat opgenomen wordt door Japanners op het vasteland. Het aantal honderdjarigen bleek op Okinawa ook hoger te zijn en het aantal sterfgevallen tengevolge van o.a. hart-en vaatziekten en kanker bleek slechts 60 à 70% van het Japanse gemiddelde te bedragen (Kagawa, 1978; Willcox *et al.*, 2006).

Ook het *Biosphere 2* project verschaftte een aantal inzichten i.v.m. de effecten van langdurige CR op de mens. *Biosphere 2* is een ecologisch systeem in de woestijn van Arizona met een oppervlakte van 12 750 m² dat volledig afgesloten is van de buitenwereld door glas en staal. De bedoeling was om een soort mini-wereld na te bouwen waar de bemanning (4 mannen en 4 vrouwen) gedurende een periode van twee jaar volledig in hun eigen behoeften zou moeten voorzien. Op een aantal kleine items na die noodzakelijk waren voor het onderzoek, werd geen enkel materiaal in- of uitgevoerd. Omdat de opbrengst van de gewassen in *Biosphere 2* minder groot was dan voorspeld, werd de bemanning onverwacht onderworpen aan CR. Het grotendeels vegetarische dieet was arm aan vetten en cholesterol, maar rijk aan vezels, en bevatte voldoende hoeveelheden proteïnen. Het werd aangevuld met een dagelijkse hoeveelheid vitaminen en mineralen. Een gelijkaardig dieet werd eerder gebruikt bij het onderzoek naar CR in knaagdieren en veroorzaakte daar karakteristieke fysiologische veranderingen en een verlenging van de levensduur (Walford *et al.*, 1992). Alle bemanningsleden vertoonden een significant verlies aan gewicht. Bovendien veroorzaakte het calorie-arme dieet fysiologische, hematologische, hormonale en biochemische veranderingen die overeenkomsten vertonen met veranderingen die waargenomen worden in knaagdieren en apen op gelijkaardige diëten. Ondanks het aanzienlijke gewichtsverlies waren alle bemanningsleden in goede gezondheid en waren ze in staat om gedurende twee jaar een hoge mate van fysieke en mentale activiteit vol te houden (Walford *et al.*, 1992; Walford *et al.*, 2002).

Tenslotte toonden zeer recente studies aan dat in niet-obese personen langdurige CR het risico op aderverkalking en verminderde hartfunctie, beide frequente doodsoorzaken in de Westerse wereld, drastisch verminderde (Fontana *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006).

Wat betreft de potentiële levensduurverlengende effecten van CR in de mens, lopen de meningen sterk uiteen. De ene groep onderzoekers baseert zich op de veelbelovende experimenten met apen om te speculeren dat een verlenging van de levensduur mogelijk zou kunnen zijn (Ingram *et al.*, 2006; Weindruch, 2006). Ook de vaststelling dat CR de levensduur van een zeer grote variëteit aan organismen verlengt, lijkt deze zienswijze te ondersteunen (Masoro, 2006; Yu, 2006). De realiteit is echter dat er geen gegevens bestaan over de effecten van CR op de levensduur van de mens en dat het weinig waarschijnlijk is dat er ooit zekerheid over zal zijn. Anderen beroepen zich op evolutieve theorieën om te beweren dat de kans vrijwel onbestaande is dat CR de levensduur van de mens aanzienlijk zal kunnen verlengen. Zo wordt gesuggereerd dat CR geen verlenging van de levensduur zal veroorzaken in organismen die, zoals vogels of de mens, in staat zijn om een omgeving te verlaten als er hongersnood dreigt (Le Bourg, 2006). Phelan en Rose (2005, 2006) veronderstellen dat het effect van het dieet op de levensduur in verhouding staat tot de

hoeveelheid energie dat een organisme spendeert aan reproductie. Aangezien primaten, waaronder de mens, 10x minder energie investeren in reproductie in vergelijking met knaagdieren, zullen deze organismen veel minder effect ondervinden van langdurige CR. Een nieuwe verklaring voor de anti-verouderingseffecten van CR wordt gegeven door de 'metabole stabiliteit hypothese' (Demetrius, 2004). Deze hypothese stelt dat de levensduur gecontroleerd wordt door de stabiliteit van de metabole netwerken, of met andere woorden door de mogelijkheid om terug te keren naar de oorspronkelijke toestand na een verstoring. Volgens deze theorie zou CR een verhoging van de metabole stabiliteit, en dus ook de levensduur, tot gevolg hebben met een impact die afhankelijk is van de ecologische beperkingen van de soort. Lage entropie soorten (gekenmerkt door vroege seksuele maturiteit, korte periode van reproductie, groot aantal nakomelingen en korte levensduur) hebben een beperkte metabole stabiliteit. Er wordt voorspeld dat CR in deze organismen een grote verlenging van de levensduur zal veroorzaken. Omdat in hoge entropie soorten zoals de mens (gekenmerkt door late seksuele maturiteit, lange periode van reproductie, klein aantal nakomelingen en lange levensduur) de metabole stabiliteit reeds meer in evenwicht is, voorspelt de theorie dat de effecten van CR in deze soorten klein tot verwaarloosbaar zullen zijn (Demetrius, 2004; Braeckman *et al.*, 2006).

5.2 Overzicht van enkele geconserveerde pathways

5.2.1 Insuline/IGF-1 signalisatie

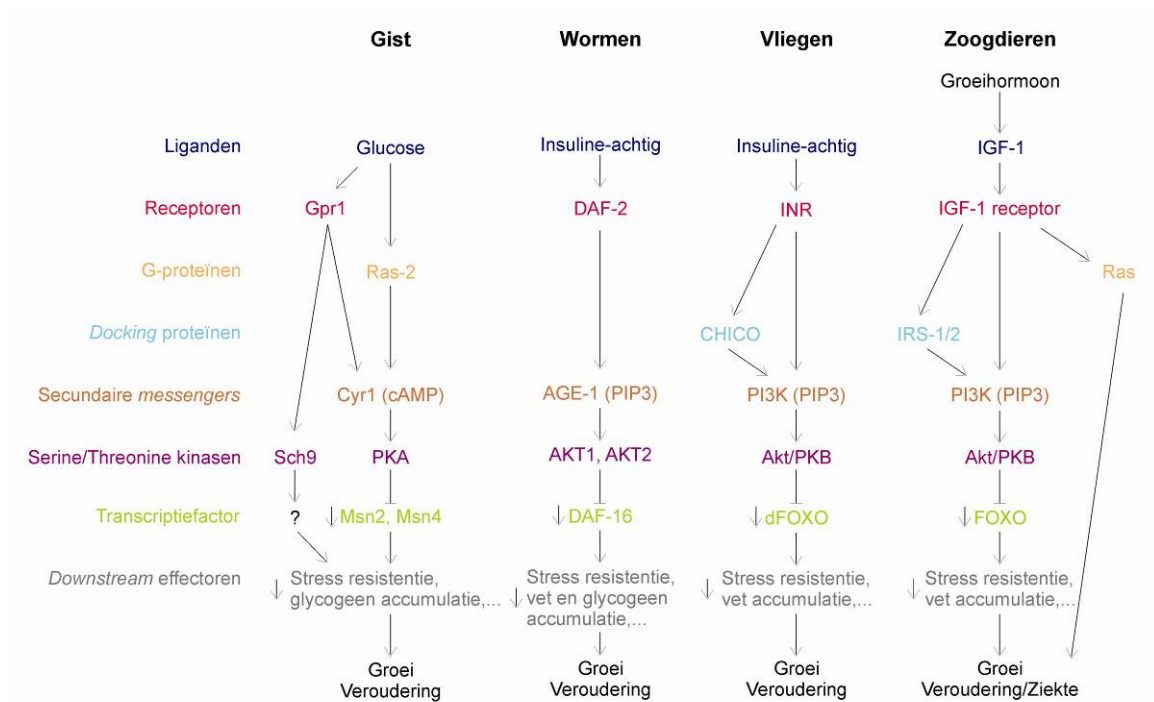
Hoewel het onderliggende mechanisme van de verlengde levensduur nog niet volledig ontrafeld is, is het gekend dat mutaties in genen die similariteit vertonen met het insuline/IGF-1 signaaltransductiepad in de mens, een verlengde levensduur veroorzaken in een variëteit aan organismen, gaande van gist, over wormen en fruitvliegen, tot knaagdieren. Zowel de genetische homologie, als fenotypische overeenkomsten tussen de verschillende insuline/IGF-1 *pathway* mutanten, doen vermoeden dat dit fundamentele mechanisme van veroudering geconserveerd is tussen gist en zoogdieren (Fig. 5.5). Zo worden deze mutanten, naast een verlengde levensduur, vaak ook gekenmerkt door een kleine lichaamsgrootte, een gereduceerde fertiliteit, een veranderd metabolisme (veelal met de accumulatie van vetten tot gevolg) en een verhoogde stressresistentie (Kenyon, 2001; Partridge en Gems, 2002; Tissenbaum en Guarente, 2002; Barbieri *et al.*, 2003; Longo en Finch, 2003; Tatar *et al.*, 2003; Barthel *et al.*, 2005).

5.2.1.1 *S. cerevisiae*

Hoewel de gist *S. cerevisiae* geen echte insuline *pathway* heeft, zijn precursoren van deze signalisatiecascade wel aanwezig in dit organisme. In een genetische *screen* naar verlengde levensduur in niet-delende gistmutanten, werd *SCH9*, het gist homoloog van *C. elegans* en zoogdier AKT, geïdentificeerd (Fabrizio *et al.*, 2001). De respons op glucose in gist wordt o.a. gemedieerd door twee proteïne kinasen, PKA (cAMP-afhankelijk Proteïne Kinase A) en

Sch9, die groei en glycolyse stimuleren (Fig. 5.5) (Thevelein en De Winde, 1999). Mutaties in deze genen veroorzaken een verlengde levensduur. *Reduction-of-function* mutaties in de PKA *pathway* verlengen zowel de replicatieve levensduur van delende cellen, als de postmitotische levensduur van cellen in de stationaire fase (Lin *et al.*, 2000; Fabrizio *et al.*, 2001). Mutaties in *SCH9* veroorzaken een drie-voudige verlenging van de levensduur van stationaire fase cellen (Fabrizio *et al.*, 2001). Naast een verlengde levensduur veroorzaakt de inactivering van de PKA en Sch9 *pathways* ook een verhoogde resistentie tegen warmte en oxidatieve stress (Fabrizio *et al.*, 2001).

Indien *sch9Δ* cellen onderworpen werden aan CR werd geen verdere verlenging van de levensduur waargenomen, wat wijst op de betrokkenheid van deze *pathway* in de respons op CR in gist (Kaeberlein *et al.*, 2005).

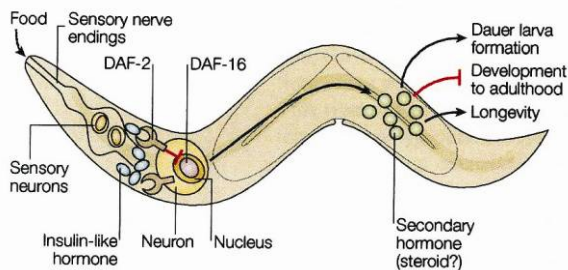


Figuur 5.5: De insuline/IGF-1 *pathway* is evolutief geconserveerd (naar: Longo en Finch, 2003).

5.2.1.2 *C. elegans*

Onder groeibevorderende condities (in aanwezigheid van nutriënten) veroorzaakt de activering van DAF-2 een intracellulaire signalisatiecascade die uiteindelijk resulteert in de fosforylering van de FOXO transcriptiefactor DAF-16, de belangrijkste modulator van de levensduur in *C. elegans* (Fig. 5.6). Zoals beschreven in Hoofdstuk 4.3.1, codeert *daf-2* voor de enige insuline-achtige receptor in *C. elegans*. De activering van de receptor gebeurt via de binding van een agonistisch ligand en resulteert in de activering van een fosfatidylinositol-3-OH kinase (PI3K), opgebouwd uit AAP-1 en AGE-1 (Morris *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997; Wolkow *et al.*, 2002). DAF-18, een humaan PTEN analoog met 3-fosfatase activiteit is een antagonist van dit kinase (Ogg en Ruvkun, 1998). De lipide second messenger PIP₃ activeert het Akt/PKB kinase homoloog PDK-1 (Paradis en Ruvkun, 1999), dat

op zijn beurt AKT-1, AKT-2 en SGK-1 activeert (Paradis en Ruvkun, 1998; Hertweck *et al.*, 2004). Deze moleculen vormen een trimeer complex dat DAF-16 kan fosforyleren, waardoor deze verhuist van de nucleus naar het cytoplasma, met de expressie van genen voor snelle groei en maximale reproductie tot gevolg. Sterke mutaties die de activiteit van *daf-2* of genen die positief gereguleerd worden door *daf-2* verminderen, veroorzaken de constitutieve vorming van dauers, een diapause stadium dat gekenmerkt wordt door een verlengde levensduur, een veranderd metabolisme, de accumulatie van vet en een verhoogde stressresistentie (Albert en Riddle, 1988; Burnell *et al.*, 2005, 1989; Larsen, 1993; Vanfleteren en De Vreese, 1995). Zwakkere of temperatuursensitieve mutaties resulteren in adulten met een verlengde levensduur. Bovendien vertonen deze mutanten een verhoogde expressie van SOD en catalase, waardoor ze resistenter zijn tegen oxidatieve stress (Vanfleteren, 1993; Honda en Honda, 1999; Houthoofd *et al.*, 2005). Deze fenotypes worden gesupprimeerd door mutaties in *daf-18* en *daf-16* (Kenyon *et al.*, 1993; Gottlieb en Ruvkun, 1994; Larsen *et al.*, 1995; Dorman *et al.*, 1995).



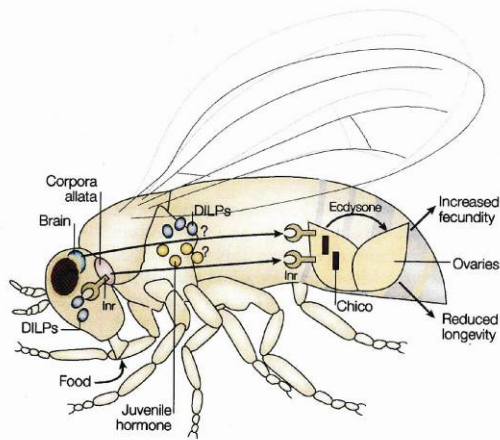
Figuur 5.6: Model voor de neuroëndocriene regulatie van de levensduur in *C. elegans*. Voedsel stimuleert de productie van een insuline-achtig peptide hormoon door de chemosensorische neuronen. Dit werkt in op DAF-2, dat ook tot expressie komt in het zenuwstelsel, en veroorzaakt de productie van een secundaire *messenger*. Deze beïnvloedt op zijn beurt ontwikkeling en veroudering in het hele organisme (Partridge en Gems, 2002).

De rol van de insuline/IGF-1 *pathway* in de respons op CR in *C. elegans* werd uitgebreid onderzocht. Zoals beschreven in Hoofdstuk 4.3.5.3.2, tonen de resultaten duidelijk aan dat CR in deze nematode geen gevolg is van een verlaagde insuline/IGF-1 signalisatie.

5.2.1.3 *D. melanogaster*

In de fruitvlieg is de insuline/IGF-1 *pathway* opgebouwd uit de insuline/IGF-1 receptor INR (Chen *et al.*, 1996), het insulinerceptor substraat CHICO (Böhni *et al.*, 1999), het PI3K Dp60/Dp110 (Leevers *et al.*, 1996) en zijn antagonist PTEN (Goberdhan *et al.*, 1999), en het PI3K *target* PKB, beter gekend als Akt1 (Fig. 5.5 en 5.7) (Verdu *et al.*, 1999). De *D. melanogaster* insuline-achtige receptor is een homoloog van de *C. elegans* DAF-2 receptor en de zoogdier insuline en IGF-1 receptoren. Activering van INR na binding van één van de zeven insuline-achtige liganden (Brogiolo *et al.*, 2001), resulteert in de fosforylatie van dFOXO, het equivalent van *C. elegans* DAF-16 en zoogdier FOXO3a (Jünger *et al.*, 2003; Puig *et al.*, 2003). Deze signalisatiecascade reguleert zowel groei, als lichaamsgrootte (Weinkove en Leevers, 2000) en de levensduur. Tatar en collega's (2001) rapporteerden dat een mutatie in *InR* de levensduur significant kon verlengen. Meer bepaald vrouwtjes met een heteroallelisch genotype zijn klein en steriel en leven 85% langer dan wild type vliegen. Deze langlevende mutanten vertonen een aantal overeenkomsten met wild type vliegen in reproductieve diapause, zoals een verhoogde accumulatie van triglyceriden, een verhoogde

SOD activiteit en een verminderde productie van JH (Juveniel Hormoon), een neurohormoon dat een stimulerende invloed heeft op de reproductie. Het insulinerceptor substraat CHICO koppelt receptor activering aan PI3 kinase signalisatie (Böhni *et al.*, 1999). Nul mutaties in *chico* veroorzaken een verlenging van de levensduur met ongeveer 45%. Bovendien hebben homozygote *chico* vliegen een verhoogde SOD activiteit, een kleinere lichaamsgrootte, een verhoogde vetopstapeling en een verminderde fertiliteit (Böhni *et al.*, 1999; Clancy *et al.*, 2001). Experimenten waarbij de effecten van *chico* op de lichaamsgrootte en fertiliteit onderdrukt werden, toonden aan dat zowel het dwerg fenotype als de steriliteit niet vereist zijn voor de verlengde levensduur van deze mutanten. Bovendien bleek er geen duidelijke correlatie te zijn tussen de levensduur en resistentie tegen stress (Clancy *et al.*, 2001).

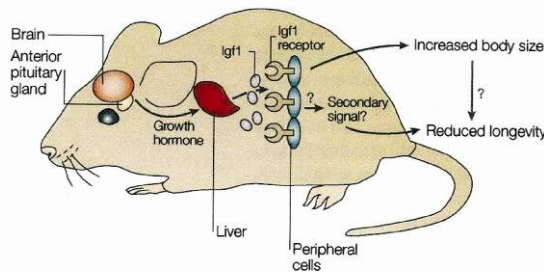


Figuur 5.7: Model voor de neuroëndocriene regulatie van de levensduur in *D. melanogaster*. *Drosophila* insuline-achtige peptiden (DILPs) worden door de hersenen geproduceerd als respons op voedselsignalen uit de omgeving. De DILPs werken mogelijk direct in op de eierstokken, waar ze de productie van ecdysone stimuleren. Een alternatieve mogelijkheid is dat ze de productie van het juveniel hormoon door de *corpora allata* stimuleren (Partridge en Gems, 2002).

Naar analogie met *C. elegans* werd in *D. melanogaster* aangetoond dat insuline signalisatie de levensduur op een niet-autonome manier beïnvloedt vanuit een beperkt aantal cellen of een specifiek weefsel. In *C. elegans* blijken voornamelijk de intestinale cellen en de neuronen in dit opzicht belangrijk (Libina *et al.*, 2003). In fruitvliegen werd aangetoond dat de activering van dFOXO in het vetlichaam voldoende is om de levensduur te verlengen, de resistentie tegen stress te verhogen en het lipide metabolisme in het volledige organisme te veranderen (Hwangbo *et al.*, 2004). Dit impliceert de betrokkenheid van secundaire signalen *downstream* van geactiveerd dFOXO in het vet lichaam. Zowel JH als ecdysone zijn gereduceerd in *D. melanogaster InR* mutanten en beide hormonen hebben het potentieel om de levensduur te reguleren (Tatar *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2003). Recente gegevens suggereren echter dat een insuline-achtig peptide zelf zou kunnen functioneren als secundaire messenger, aangezien *dilp-2* (*Drosophila* insuline-like peptide) specifiek geïnhibeerd wordt wanneer dFOXO geactiveerd wordt in het vet lichaam (Hwangbo *et al.*, 2004). Ook dit is in overeenstemming met bevindingen in *C. elegans*, waar de expressie van het insuline-achtige peptide *ins-7* onder controle staat van DAF-16 (Murphy *et al.*, 2003). In tegenstelling tot *C. elegans*, blijkt de insuline/IGF-1 *pathway* wel een rol te spelen in de respons op CR in *D. melanogaster*, aangezien *chico* vliegen minder efficiënt reageren op CR dan wild type vliegen. Gerestricteerde wild type vliegen vertoonden een maximale levensduur bij een lagere voedselconcentratie dan mutante vliegen. Dus, *chico* vliegen gedragen zich alsof ze al gerestricteerd zijn, waardoor ze vatbaarder zijn voor verhongering (Clancy *et al.*, 2002).

5.2.1.4 Zoogdieren

In tegenstelling tot wormen en vliegen, die slechts één enkele insuline/IGF-1 receptor bezitten, hebben zoogdieren vier homologe receptoren die elk vermoedelijk door slechts één ligand gebonden worden: de insulinerceptor (Insr), de IGF-1 en IGF-2 receptoren en de insulinerceptor-gerelateerde receptor (Insr) (Navarro *et al.*, 1999). Activering van deze receptoren leidt tot de recruterings en fosforylatie van IRS-1 en IRS-2, die fungeren als *docking* proteïnes voor PI3K (Sun *et al.*, 1991). Dit resulteert in signalisatie via PI3K en proteïne kinase B/Akt (Cichy *et al.*, 1998) ter hoogte van de celmembraan. Akt fosforyleert en inactieveert op zijn beurt de zoogdier FOXO transcriptiefactoren (Fig. 5.5 en 5.8) (Brunet *et al.*, 1999; Kops *et al.*, 1999). Zoogdieren bezitten vier FOXO eiwitten: FOXO1 (of FKHR), FOXO3 (of FKHL1), FOXO4 (of AFX) en FOXO6. Deze transcriptiefactoren reguleren de voortgang van de celcyclus, metabolisme en apoptose, en bevorderen resistentie tegen oxidatieve stress door te binden op IRS (*Insulin Respons Sequence*) motieven in het DNA (Cichy *et al.*, 1998; Nakae *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2002; Gilley *et al.*, 2003; Barthel *et al.*, 2005). De insuline/IGF-1 *pathway* is dus evolutief sterk geconserveerd en blijkt in zoogdieren een belangrijke rol te spelen in het mediëren van de effecten van insuline op het metabolisme, zoals ook wordt waargenomen in *C. elegans* en *D. melanogaster*. Maar is deze *pathway* ook betrokken bij de regulatie van de levensduur in zoogdieren?



Figuur 5.8: Model voor de neuroëndocriene regulatie van de levensduur in de muis. Dit model veronderstelt dat IGF-1 en niet insuline een modulator van de levensduur is in zoogdieren (Partridge en Gems, 2002).

Insuline is betrokken bij celgroei en glucose homeostase, en bevordert de opname van glucose door cellen en de omzetting ervan tot vet. Een verminderde functie van Insr resulteert in type II (niet insuline-afhankelijke) diabetes en een verkorting van de levensduur. Een volledig verlies van de insulinerceptor activiteit veroorzaakt leprechaunisme in de mens, een syndroom dat gekarakteriseerd wordt door een laag geboortegewicht, hyperinsulinisme, mentale achterstand en een vroegtijdige dood (Krook *et al.*, 1993). In muizen leidt een *loss-of-function* mutatie in deze receptor tot neonatale lethaliteit (Accili *et al.*, 1996). Deze waarnemingen laten vermoeden dat een verminderde insuline signalisatie in zoogdieren geen rol speelt in de regulatie van de levensduur. Echter, de volledige uitschakeling van de activiteit van de insuline/IGF-1 receptor veroorzaakt ook lethaliteit in vliegen (Weinkove en Leivers, 2000) en wormen (Gems *et al.*, 1998). Het is dus mogelijk dat een beperkte reductie van de insuline signalisatie de snelheid van veroudering kan vertragen in zoogdieren (Gems en Partridge, 2001).

IGF-1 bevordert groei, proteïnesynthese en de overleving van de cel, en wordt voornamelijk geproduceerd door de lever als respons op groeihormoon dat gesecreteerd wordt door de hypofyse. Analyse van mutante dwergmuizen met verminderde hoeveelheden circulerend IGF-1 toonde aan dat een verminderde IGF-1 signalisatie de levensduur van muizen kan

verlengen. De Ames en Snell dwergmuizen ontstonden door spontane mutaties in de respectievelijke genen *Prop1* en *Pit1*. Deze transcriptiefactoren reguleren de ontwikkeling van de hypofyse en mutaties in deze genen veroorzaken een vertraagde ontwikkeling, een gereduceerde lichaamsgrootte en een sterk verminderde fertiliteit. Ames en Snell dwergmuizen leven echter tot 40 à 60% langer en zijn resistenter tegen oxidatieve stress. Zo vertonen de Ames muizen minder oxidatieve schade aan DNA en eiwitten en hebben ze een verhoogde SOD en catalase activiteit (Brown-Borg *et al.*, 1996; Bartke *et al.*, 2001a; Flurkey *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2003). Hoewel de Ames en de Snell muizen deficiënt zijn in de productie van groeihormoon, schildklier-stimulerend hormoon en prolactine, zijn er verschillende aanwijzingen die suggereren dat de gereduceerde hoeveelheid groeihormoon (en dus IGF-1) aan de basis ligt van de verlengde levensduur. Zo bleek de overproductie van groeihormoon in transgene muizen te leiden tot een stijging in de concentratie van IGF-1 in het bloed plasma, met een verkorting van de levensduur tot gevolg (Naar *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1993). Bovendien werd aangetoond dat muismodellen met defecten die leiden tot de selectieve vermindering van de hoeveelheid groeihormoon en IGF-1, langlevend zijn. Groeihormoonreceptor *knockout* muizen hebben 90% minder plasma IGF-1, zijn klein, maar voor het overige gezond, en leven langer (Coschigano *et al.*, 2000). De 'little mouse' heeft een defect in het groeihormoon-vrijstellend hormoonreceptor gen (*Ghrhr*), waardoor het slechts 1% van de normale hoeveelheid groeihormoon overhoudt. Dit gaat gepaard met een sterke daling van de concentratie Igf1 en een verlengde levensduur (Flurkey *et al.*, 2001). Tenslotte werd vastgesteld dat heterozygote IGF-1 receptor *knockout* muizen gemiddeld 26% langer leven dan wild type controlemuizen. Deze muizen zijn ook resistenter tegen oxidatieve stress (Holzenberger *et al.*, 2003).

Naar analogie met resultaten in *C. elegans* en *D. melanogaster*, werden ook in een muismodel aanwijzingen gevonden dat insuline signalisatie de levensduur op een niet cel-autonome reguleert. De specifieke uitschakeling van de insulinereceptor in het vetweefsel van FIRKO muizen veroorzaakt een reductie van de vetmassa en een verlengde levensduur. Verschillende endocriene veranderingen in de vetcellen zouden aan de basis liggen van dit effect. De verlengde levensduur is geen gevolg van CR, aangezien de muizen een normale voedselopname hebben (Blüher *et al.*, 2003).

Verschillende studies met honderdjarigen toonden tenslotte aan dat de hoeveelheid plasma IGF-1 ook gecorreleerd is met de levensduur in de mens. Typische kenmerken die gedeeld worden door gezonde honderdjarigen zijn een behoud van de glucose tolerantie, een verhoogde insuline gevoeligheid en een lagere concentratie IGF-1 in het bloed plasma in vergelijking met jongere individuen. Dus, een efficiënte insuline/IGF-1 respons heeft een impact op de levensduur van de mens (Paolisso *et al.*, 1996; Barbieri *et al.*, 2003; Bonafè *et al.*, 2003).

De rol van insuline/IGF-1 signalisatie in de respons op CR in knaagdieren is tot op heden nog niet helemaal duidelijk. Een gereduceerde opname van voedsel leidt in deze dieren tot een lagere concentratie van insuline (Kalant *et al.*, 1988) en IGF-1 (Breese *et al.*, 1991) in het bloed plasma. CR veroorzaakt bovendien een lagere productie van ROS in de mitochondriën (Lopez-Torres *et al.*, 2002; Lambert en Merry, 2004) en dit is een gevolg van een daling van

de mitochondriale membraanpotential. Deze effecten kunnen omgekeerd worden door gerespecteerde ratten gedurende een periode van twee weken te behandelen met insuline (Lambert en Merry, 2004). Tegenstrijdige resultaten werden echter gerapporteerd door Bartke en collega's (2001b) die vaststelden dat CR de levensduur van langlevende Ames dwerg muizen verder kon verlengen. De auteurs concludeerden dan ook dat een verminderde insuline/IGF-1 signalisatie veroudering vertraagt via een mechanisme dat verschillend is van CR. Deze conclusie werd echter betwist door Clancy en collega's (2002) die suggereerden dat Ames dwerg muizen residuele IGF-1 activiteit hebben die verder verlaagd wordt door de initiatie van CR, wat een verdere verlenging van de levensduur zou verklaren. Andere onderzoeksgroepen vonden dat CR en een verminderde groeihormoon en IGF-1 signalisatie een invloed uitoefenen via gedeeltelijk overlappende mechanismen. *Microarray* analyse van lever-specifieke genen in goed gevoede en gerespecteerde Ames dwergmuizen, toonde aan dat de dwergmutatie en CR een gedeeltelijk overlappende set van genen beïnvloeden en een additief effect hebben op een subset van deze genen (Tsuchiya *et al.*, 2004). In een latere studie werden wild type en groeihormoonreceptor *knockout* (GHRKO) muizen onderworpen aan CR, waarna de effecten van beide genotypes op verschillende parameters onderzocht werd. Zo werd in beide gevallen een gereduceerde hoeveelheid Akt vastgesteld, wat de hypothese ondersteunt dat insuline/IGF-1 signalisatie een rol speelt bij veroudering. Gluconeogenese-genen in de lever vertoonden een verhoogd expressiepatroon in GHRKO muizen, maar niet in wild type muizen. Het histon deacetylase SIRT1 werd geïnduceerd door CR, maar niet door de GHRKO mutatie. In GHRKO muizen tenslotte, werd FOXO1 en MnSOD expressie geïnduceerd, wat een verhoogde resistentie tegen oxidatieve stress in de lever van deze muizen suggereert. Deze veranderingen werden niet waargenomen in gerespecteerde wild type muizen (Al-Regaiey *et al.*, 2005).

5.2.2 Sirtuïnes als regulatoren van de levensduur

5.2.2.1 Positieve regulatie van de levensduur

5.2.2.1.1 *S. cerevisiae*

SIR2 werd oorspronkelijk geïdentificeerd als één van vier genen (*SIR1-4*) die de extra kopijen met *mating type* informatie represseren in *S. cerevisiae*. Een genetische studie in deze gist leidde vervolgens tot de identificatie van *SIR2* als een regulator van de replicatieve levensduur (Kennedy *et al.*, 1995). Een mutatie in *SIR2* veroorzaakt een verkorting van de levensduur, terwijl extra kopijen de levensduur verlengen (Kaeberlein *et al.*, 1999). Een oorzaak van veroudering in *S. cerevisiae* is de accumulatie van extrachromosomale rDNA cirkels (ERC's) (Sinclair en Guarente, 1997). Door recombinatie ter hoogte van de rDNA locus te onderdrukken, verhindert Sir2 de vorming van ERC's, wat resulteert in een verlenging van de levensduur (Kaeberlein *et al.*, 1999). Of deze ERC's op zich een oorzaak van veroudering zijn in gist is nog onderwerp van discussie. Mogelijk ligt de te hoge expressie van de rDNA genen aan de basis van veroudering (Guarente, 2003). Verder werd aangetoond dat onder

welbepaalde condities (activering van de *retrograde* respons, zie verder) de massale accumulatie van ERC's gepaard gaat met een verlengde levensduur (Conrad-Webb en Butow, 1995; Kirchman *et al.*, 1999). Tenslotte blijkt de vorming van ERC's een gist-specifiek mechanisme van veroudering te zijn, aangezien de vorming van deze cirkels in geen enkel ander organisme werd aangetoond.

De vaststelling dat *SIR2* codeert voor een NAD⁺-afhankelijk histon deacetylase (Imai *et al.*, 2000) en de centrale rol die NAD⁺ speelt in metabole reacties, suggereerde een link tussen het energie metabolisme en de levensduur. De Sir2 eiwitten werden daarom naar voor geschoven als kandidaat regulatoren van de levensduur onder condities van CR (Guarente, 2000). Of Sir2 ook effectief betrokken is bij het mediëren van de effecten van CR in gist, blijft tot op heden echter controversieel. Zowel de verlaging van de hoeveelheid glucose in het kweekmedium, als een mutatie in de PKA *pathway* veroorzaakten een verlenging van de levensduur in wild type gistcellen, maar niet in *sir2Δ* mutanten. Mutaties in transcriptiefactoren die de expressie van stressdefensie genen induceren, toonden aan dat de effecten van CR, althans in gist, niet het gevolg zijn van een verhoogde stressresistentie (Lin *et al.*, 2000; Fabrizio *et al.*, 2004). Het eiwit Fob1 is vereist voor de recombinatie van rDNA en de vorming van ERC's. Een mutatie in het *FOB1* gen onderdrukt de hyperrecombinatie van het rDNA en de korte levensduur van *sir2Δ* mutanten. De wild type levensduur van een *fob1Δ sir2Δ* dubbelmutant kon niet verder verlengd worden door een mutatie in een gen dat instaat voor de respons op de beschikbaarheid van glucose. Deze resultaten suggereren dat CR de levensduur verlengt door recombinatie ter hoogte van de rDNA locus te verlagen en bijgevolg de vorming van ERC's te inhiberen. Dit effect op recombinatie is vermoedelijk het gevolg van een verhoogde *silencing* door Sir2 (Lin *et al.*, 2000). De rol van Sir2 in het mediëren van de levensduurverlengende effecten van CR bleek echter stam-specifiek te zijn, aangezien later werd aangetoond dat CR in andere giststammen de levensduur op een *SIR2*-onafhankelijke manier kon verlengen (Jiang *et al.*, 2002; Kaeberlein *et al.*, 2004). Uit een later rapport werd geconcludeerd dat Hst2 verantwoordelijk was voor de Sir2-onafhankelijke levensduurverlenging tengevolge van CR. Hst2 is een Sir2 homoloog dat eveneens NAD⁺-afhankelijke deacetylase activiteit vertoont. Net als Sir2, blijkt ook Hst2 de levensduur te verlengen als respons op CR door de vorming van ERC's te inhiberen (Lamming *et al.*, 2005). Deze resultaten werden recent echter weerlegd door Kaeberlein en collega's (2006). Extra onderzoek is dus dringend vereist om definitief uit te maken welke rol Sir2 speelt bij de levensduurverlengende effecten van CR in gist.

5.2.2.1.2 *C. elegans* en *D. melanogaster*

De Sir2 proteïnen zijn sterk geconserveerd in een uitgebreide waaier aan organismen, gaande van bacteriën tot metazoa (Frye, 2000). Ondanks het feit dat er geen bewijs is voor de vorming van ERC's in andere organismen dan gist, blijkt *SIR2* toch een determinant van de levensduur te zijn in *C. elegans* en *D. melanogaster*. Zo veroorzaakt de overexpressie van *sir-2.1* een DAF-16-afhankelijke levensduurverlenging in *C. elegans* (Tissenbaum en Guarente, 2001). De effecten van CR worden in deze nematode echter niet gemedieerd door SIR-2.1 (zie Hoofdstuk 4.3.5.3.3). In *D. melanogaster* veroorzaakte de overexpressie van

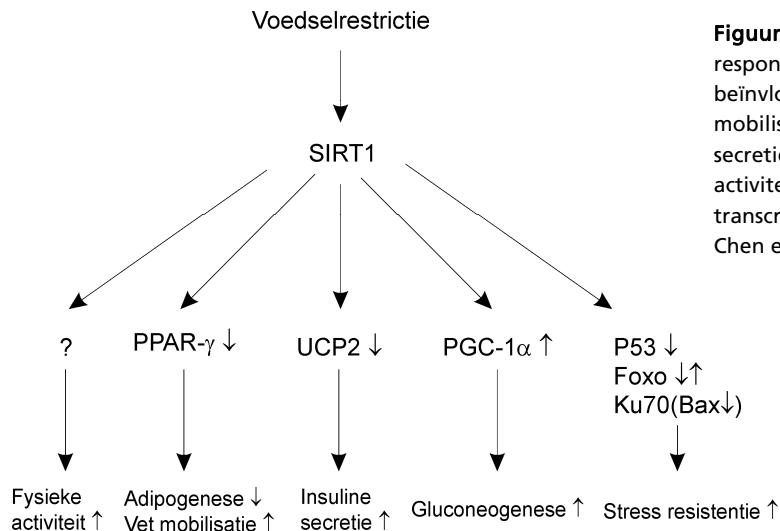
dSir2 eveneens een significante verlenging van de levensduur. In tegenstelling tot *C. elegans*, vertoonden vliegen die onderworpen werden aan CR geen verlengde levensduur in de afwezigheid van *dSir2* expressie. Bovendien kon de levensduur niet verder verlengd worden door CR indien de vliegen reeds een verhoogde *dSir2* activiteit hadden. Deze resultaten tonen aan dat CR in fruitvliegen de levensduur verlengt via een verhoogde activiteit van *dSir2* (Rogina en Helfand, 2004).

5.2.2.1.3 Zoogdieren

Zoogdieren hebben zeven SIRT genen, waarvan SIRT1 het homoloog is van gist *SIR2* (Blander en Guarente, 2004). Het eerste SIRT1 substraat dat in zoogdiercellen geïdentificeerd werd, was de tumor suppressor p53. De acetylactie van p53 tengevolge van DNA schade resulteert in zijn activering, wat op zijn beurt leidt tot inhibitie van de celcyclus of apoptose. In twee verschillende studies werd gelijktijdig aangetoond dat zoogdier SIRT1 een negatieve regulator is van p53. Een verhoogde SIRT1 activiteit leidde dan ook tot een vermindering van p53-afhankelijke apoptose in zoogdiercellen. Bovendien resulteerde de deacetylactie van p53 door SIRT1 ook in een verhoogde stressresistentie (Luo *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2001). Vervolgens werd aangetoond dat SIRT1 ook een rol speelt bij de activering/repressie van de FOXO transcriptiefactoren. Deze eiwitten blijken namelijk niet alleen gereguleerd te worden door fosforylatie, maar ook door reversibele acetylactie. Zo werd aangetoond dat de deacetylactie van Foxo1, Foxo3 en Foxo4 niet alleen verminderde apoptose, maar ook de inductie van stressresistentie genen, zoals MnSOD, tot gevolg heeft (Brunet *et al.*, 2004; Daitoku *et al.*, 2004; Motta *et al.*, 2004; Van der Horst *et al.*, 2004). Deze studies suggereren dat zoogdier Sir2 de levensduur zou kunnen verlengen door de Foxo-afhankelijke respons te verschuiven van apoptose naar stressresistentie. Het bewijs dat de activiteit van SIRT1 ook effectief de levensduur van zoogdieren kan beïnvloeden is echter nog niet geleverd.

Verschuillende waarnemingen suggereren een rol voor SIRT1 in de regulatie van CR (Fig. 5.9). (1) Wild type muizen die onderworpen worden aan langdurige CR vertonen een sterke verhoging van de fysische activiteit die gerelateerd is aan de zoekreflex naar voedsel. Hoewel CR een aantal metabole veranderingen veroorzaakt in SIRT1 *knockout* muizen die typisch zijn voor het dieet, vertonen deze dieren geen verhoogde zoekactiviteit. Deze resultaten suggereren dat SIRT1 noodzakelijk is voor de toegenomen fysieke activiteit die geobserveerd wordt in wild type gerestricteerde muizen (Chen *et al.*, 2005). (2) SIRT1 is ook betrokken bij de vorming van vetweefsel (adipogenese) en de mobilisatie van vet vanuit wit vetweefsel. De overexpressie van *SIRT1* in vetcellen vermindert adipogenese, terwijl de uitschakeling van het gen het omgekeerde effect heeft. Het effect van SIRT1 op de vorming van vetweefsel wordt gemedieerd via de binding van dit eiwit op de nucleaire hormoonreceptor PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ*), een essentiële regulator van wit vetweefsel, wat resulteert in de inhibitie van de PPAR γ target genen. Overnacht vasten leidde tot de verhoogde binding van SIRT1 ter hoogte van de PPAR γ promotor, met de mobilisatie van vet als gevolg (Picard *et al.*, 2004). (3) Ratten die onderworpen werden aan CR vertoonden in verschillende weefsels een verhoogde SIRT1

expressie in vergelijking met wild type dieren. Er werd aangetoond dat dit SIRT1 het DNA herstel eiwit Ku70 deacetyleert, waardoor deze laatste het proapoptotische eiwit Bax wegleidt van de mitochondriale membraan en aldus apoptose verhindert (Cohen *et al.*, 2004). (4) SIRT1 bevordert de vrijstelling van insuline uit de β cellen van de pancreas. De uitschakeling van *SIRT1* in deze cellen vermindert bijgevolg de secretie van insuline. SIRT1 controleert de secretie van insuline door te binden ter hoogte van de promotor regio van UCP2 (*UnCoupling Protein 2*), wat de expressie van dit eiwit verhindert. Suppressie van ontkoppeling leidt tot verhoogde ATP synthese en insuline secretie. Overnacht vasten leidde tot een verhoogde hoeveelheid UCP2. Deze verhoging werd niet waargenomen in *SIRT1 knockout* muizen, die reeds meer UCP2 hebben. Deze resultaten suggereren dus dat de activiteit van SIRT1 gereduceerd wordt door overnacht vasten (Moynihan *et al.*, 2005; Bordone *et al.*, 2006). (5) Tenslotte reguleert SIRT1 ook de glucose homeostase in de lever. Overnacht vasten leidde tot de activering van SIRT1 in de lever, met een verhoogde gluconeogenese en verlaagde glycolyse als gevolg. Deze respons werd echter niet waargenomen indien SIRT1 uitgeschakeld werd. SIRT1 reguleert de gluconeogenese door de transcriptionele coactivator PGC-1 α te deacetyleren en te activeren (Rodgers *et al.*, 2005).



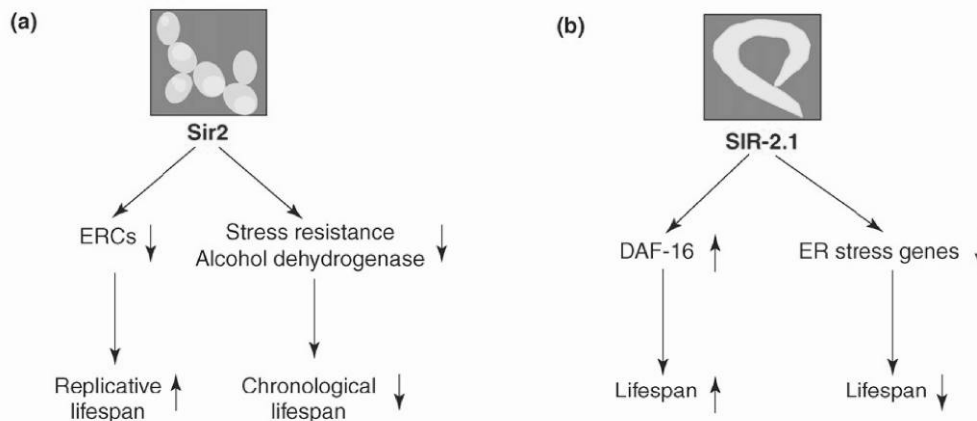
Figuur 5.9: SIRT1 is betrokken bij de respons op CR in zoogdieren. CR beïnvloedt de fysieke activiteit, vet mobilisatie, gluconeogenese, insuline secretie en stressresistentie door de activiteit van de aangeduide transcriptiefactoren te reguleren (naar: Chen en Guarente, 2007).

Hoewel een direct bewijs voor de betrokkenheid van sirtuïnes in de regulatie van de levensduur en de effecten van CR in zoogdieren nog steeds ontbreekt, zijn bovenstaande resultaten wel in overeenstemming met de speculatie dat sirtuïnes evolutionair geconserveerde regulatoren van de levensduur zijn (Chen en Guarente, 2007).

5.2.2.2 Negatieve regulatie van de levensduur

Recente studies suggereren dat Sir2 niet alleen een rol speelt als positieve regulator van de levensduur en als kandidaat controle mechanisme bij CR. Zo werd aangetoond dat de chronologische levensduur van bepaalde langlevende *S. cerevisiae* mutanten verder verlengd kon worden door een bijkomende verliesmutatie in het *SIR2* gen (Fabrizio *et al.*, 2005). Dit is in tegenstelling tot de replicatieve levensduur, waar een mutatie in *SIR2* een

verkorting van de levensduur veroorzaakt door een verhoogde vorming van ERC's (Kaeberlein *et al.*, 1999). De langlevende gisten werden bekomen door de cellen te verhongeren of door mutaties te introduceren die interfereren met de respons van de cellen op de aanwezigheid van voedsel. Een mutatie in *SIR2* veroorzaakte in deze gistcellen een verhoogde stressresistentie in vergelijking met wild type wormen. Bovendien werd een verhoogde alcohol dehydrogenase activiteit vastgesteld. Mitotisch actieve gistcellen genereren hun energie hoofdzakelijk via fermentatie, wat gepaard gaat met de productie van ethanol. Naarmate de fermenteerbare koolstofbronnen schaars worden en ethanol accumuleert, ondergaan de gistcellen een metabole shift waarbij ze ethanol gebruiken als koolstofbron. Eenmaal de beschikbare ethanol grotendeels opgebruikt is, ondergaan de cellen een groeistop en gaan ze over naar de stationaire fase, waarin ze tot enkele weken kunnen overleven. De auteurs suggereren dat de verhoogde alcoholdehydrogenase activiteit in *SIR2* mutanten zou kunnen leiden tot een snellere afbraak van ethanol in het medium en bijgevolg een snellere overgang naar de meer stabiele postmitotische fase (Fig. 5.10a) (Fabrizio *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2005).



Figuur 5.10: Sir2 heeft zowel een positieve als een negatieve invloed op de levensduur. (a) Gist Sir2 verlengt de replicatieve levensduur door de vorming van ERC's te onderdrukken, en verkort de chronologische levensduur van sommige mutanten, mogelijk door de inhibitie van stressresistentie genen en alcohol dehydrogenase. (b) *C. elegans* SIR-2.1 bevordert de levensduur via de activering van DAF-16, en verkort de levensduur door de expressie van ER stressresistentie genen te inhiberen (Chen en Guarente, 2007).

Ook in *C. elegans* blijkt SIR-2.1 zowel een positieve als een negatieve invloed op de levensduur te hebben. Hoewel de overexpressie van *sir-2.1* de levensduur verlengt via de activering van DAF-16 (Tissenbaum en Guarente, 2001; Berdichevsky *et al.*, 2006), heeft dit een negatieve invloed op de expressie van stress-defensie genen in het endoplasmatisch reticulum (ER) (Viswanathan *et al.*, 2005). De overexpressie van één van deze stressdefensie genen, *abu-11* (*activated in blocked unfolded protein response protein 11*), veroorzaakte een verlenging van de levensduur. Bovendien werd via northern blot aangetoond dat de expressie van *abu-11*, en van verschillende andere ER stressrespons genen, onderdrukt wordt door *sir-2.1*. Resveratrol, een polyfenol dat aanwezig is in rode wijn, inhibeert SIR-2.1 en induceert de expressie van verschillende ER stressdefensie genen, waaronder *abu-*

11, en dit onafhankelijk van de transcriptiefactor DAF-16 (Fig. 5.10b) (Viswanathan *et al.*, 2005).

Hoewel zoogdier SIRT1 in staat is om cellen te beschermen tegen p53-geïnduceerde apoptose na DNA schade (Luo *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2001), werd in een andere studie aangetoond dat de activiteit van SIRT1 een verhoogde TNF α -geïnduceerde apoptose tot gevolg heeft (Yeung *et al.*, 2004). De transcriptiefactor NF- κ B controleert de expressie van genen die een belangrijke rol spelen in allerlei cellulaire processen, zoals adhesie, de celcyclus en apoptose (Karin en Lin, 2002). SIRT1 verhindert de transcriptionele activiteit van NF- κ B door de deacetylatie van kritieke lysine residuen, wat resulteert in een verhoogde gevoeligheid van de cellen om apoptose te ondergaan na behandeling met TNF α . Dit wijst op de mogelijkheid van SIRT1 om een pro- of anti-overlevingssignaal te induceren, afhankelijk van de apoptotische stimulus (Yeung *et al.*, 2004).

Bovenstaande studies suggereren een model waarbij de activiteit van Sir2 de levensduur in twee richtingen kan beïnvloeden en dit via onafhankelijke stroomafwaartse effectoren (Kennedy *et al.*, 2005; Viswanathan *et al.*, 2005).

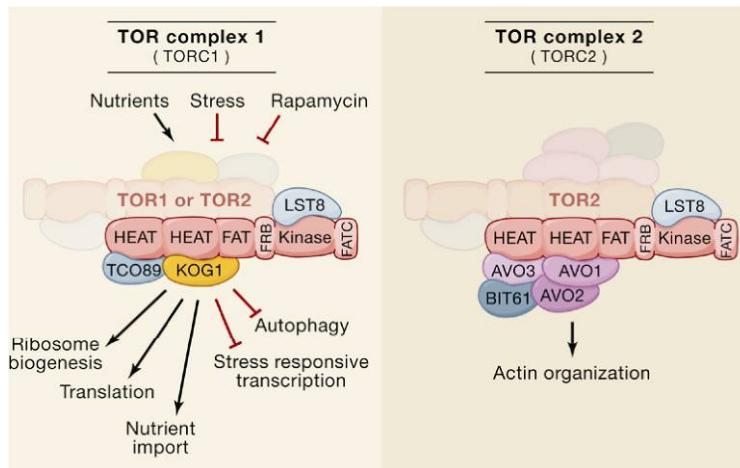
5.2.3 TOR signalisatie

5.2.3.1 Overzicht van de *pathway*

TOR proteïnen zijn sterk geconserveerd van gisten tot de mens en reguleren een variëteit aan cellulaire processen als respons op de aanwezigheid van nutriënten, zoals ontwikkeling, celgrootte, autofagie, ribosoom biogenese en translatie, carbohydraat en aminozuur metabolisme, stressrespons en actine organisatie (Schmelzle en Hall, 2000; Kapahi en Zid, 2004; Wullschleger *et al.*, 2006). De TOR proteïnen zijn serine/threonine kinasen die oorspronkelijk geïdentificeerd werden in de gist *S. cerevisiae* (Heitman *et al.*, 1991). Opeenvolgende studies toonden echter aan dat elk onderzocht eukaryoot genoom een *TOR* gen bezit (Wullschleger *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae* en *C. elegans* is TOR een regulator van globale mRNA translatie, terwijl in hogere eukaryoten TOR de expressie controleert van een beperkter aantal mRNA's die specifiek van belang zijn voor celgroei (Avruch *et al.*, 2006). Onder groei-bevorderende condities (veel aminozuren) is TOR actief wat resulteert in de fosforylatie van S6K (ribosomaal S6 kinase) en 4E-BP (eukaryoot initiatiefactor 4E-bindend proteïne). S6K wordt op die manier geactiveerd, terwijl 4E-BP, die een repressor is van mRNA translatie, geïnhibeerd wordt. Dit heeft een verhoogde eiwitsynthese tot gevolg. Een tekort aan aminozuren verhindert TOR signalisatie en leidt tot verhoogde autofagie en afbraak van proteïnen (Hay en Sonenberg, 2004; Wullschleger *et al.*, 2006).

S. cerevisiae heeft twee Tor proteïnen: Tor1, dat deel uitmaakt van het rapamycine-gevoelige TOR Complex 1 (TORC1), en het essentiële Tor2, dat zowel deel uitmaakt van TORC1, als van het rapamycine-resistente TORC2 (Fig. 5.11). Behalve Tor1 of Tor2, maken ook de TOR-geassocieerde proteïnen Kog1, Tco89 en Lst8 deel uit van TORC1. Dit complex wordt geactiveerd als respons op nutriënten en reguleert een variëteit aan cellulaire

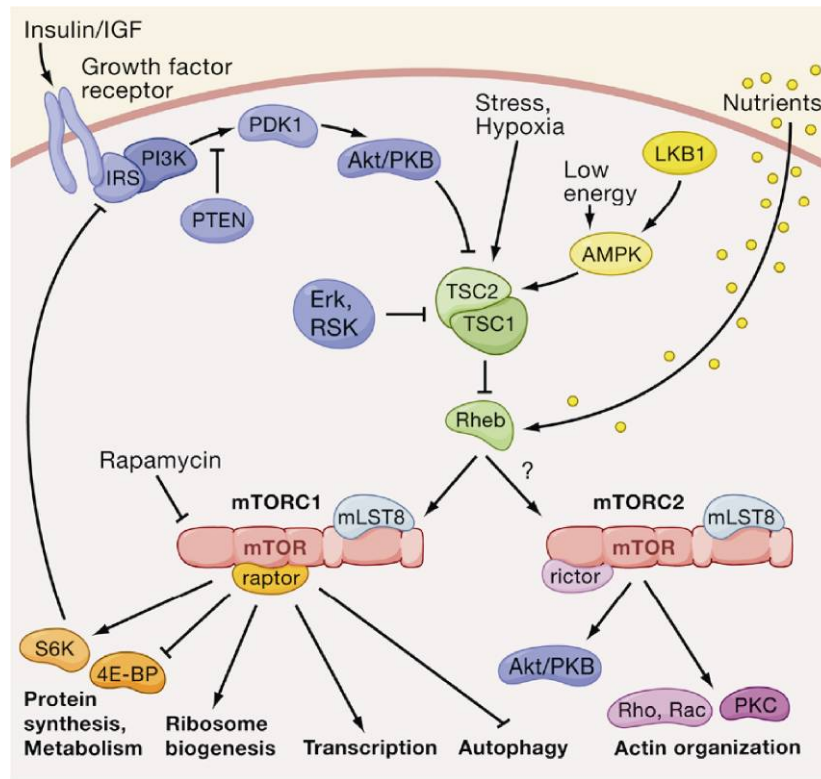
processen, zoals groei, metabolisme en stressrespons. TORC2 bevat naast Tor2 ook Avo1, Avo2, Avo3 en Lst8 en controleert de remodellering van het actine cytoskelet (Martin en Hall, 2005). In tegenstelling tot gisten bezitten hogere eukaryoten slechts één enkel *TOR* gen (Wullschlegler *et al.*, 2006). Het structurele zoogdier equivalent van TORC1 (mTORC1) werd gelijktijdig met het gist TORC1 geïdentificeerd en bestaat uit raptor (het zoogdier ortholoog van Kog1), mLst8 en mTor. Beide complexen zijn ook functioneel equivalent aangezien zij gelijkaardige *downstream* effectoren hebben, zoals o.a. S6K en 4E-BP1. Het zoogdier equivalent van TORC2 (mTORC2) bestaat uit uit mAvo3 (rictor), mLst8 en mTor en reguleert eveneens de organisatie van het actine cytoskelet (Martin en Hall, 2005). De activiteit van mTOR wordt gereguleerd door de TSC1 en TSC2 proteïnen (*Tuberous Sclerosis*) (Tee *et al.*, 2002). Deze eiwitten vormen een heterodimeer dat de activiteit van mTOR inhibeert. TSC2 functioneert als een GAP (*GTPase-Activating Protein*) voor het kleine GTPase Rheb. Rheb is actief als het gebonden is aan GTP, maar wordt geïnactiveerd door de hydrolyse van GTP naar GDP. In de GTP-gebonden, actieve toestand zal Rheb interageren met mTORC1 en aldus dit complex activeren (Li *et al.*, 2004).



Figuur 5.11: TOR Complex 1 (TORC1) en TOR Complex 2 (TORC2) van *S. cerevisiae*. TORC1 wordt geactiveerd in aanwezigheid van nutriënten. Stress en rapamycine zijn negatieve regulatoren van TORC1. De *up-stream* regulatoren van TORC2 zijn vooralsnog onbekend (Wullschlegler *et al.*, 2006).

Verschillende *inputs* convergeren ter hoogte van het TSC1-TSC2 complex (Fig. 5.12) (Wullschlegler *et al.*, 2006). Zo reageert de mTOR *pathway* op groeifactoren via insuline/IGF-1 signalisatie. Na stimulatie door insuline, wordt TSC2 gefosforyleerd en geïnactiveerd door Akt, wat leidt tot de activering van mTOR. Nutriënten, aminozuren in het bijzonder, reguleren eveneens de activiteit van mTORC1. De exacte manier waarop dit gebeurt, is nog niet gekend, maar vermoed wordt dat aminozuren mTORC1 activeren via de inhibitie van TSC1-TSC2, of alternatief, via de stimulatie van Rheb. De afwezigheid van Rheb en TSC orthologen in *S. cerevisiae* en *C. elegans* suggereert dat de aminozuur *pool* in deze organismen rechtstreeks waargenomen wordt door TOR. Ook de energiestatus van een cel wordt doorgegeven aan mTORC1. Dit gebeurt via AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*), dat geactiveerd wordt bij een hoge AMP/ATP ratio (Kimura *et al.*, 2003). Er werd ook aangetoond dat geactiveerd AMPK TSC2 fosforyleert ter hoogte van een serine residu dat verschillend is van de plaats van Akt fosforylering. Dit resulteert in de activering van TSC2 en de inhibitie van mTOR signalisatie (Inoki *et al.*, 2003). Ook stresscondities leiden tot de activering van het TSC1-TSC2 complex met de inhibitie van de mTOR *pathway* tot gevolg. De

TOR *pathway* in *D. melanogaster* is zeer gelijkaardig is aan deze in zoogdieren (Oldham en Hafen, 2003).



Figuur 5.12: Overzicht van de TOR *pathway* in zoogdiercellen (Wullschleger et al., 2006).

Net zoals in *C. elegans*, waar verschillende waarnemingen wijzen op een interactie tussen insuline signalisatie en de TOR *pathway* (Murphy *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 2006), zijn er ook in zoogdieren en *D. melanogaster* aanwijzingen die een link tussen beide suggereren. Eerst en vooral wordt de activiteit van mTOR rechtstreeks gereguleerd door insuline signalisatie via de fosforylatie van TSC2 door PKB/Akt. Deze fosforylatie bleek niet enkel de activiteit van TSC2 te reduceren, maar ook de stabiliteit van het eiwit te verminderen, met de disruptie van het TSC1-TSC2 complex tot gevolg (Inoki *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2002). Bovendien werd in *D. melanogaster* aangetoond dat de TOR en insuline/IGF-1 *pathways* de activiteit van dezelfde effectoren te kunnen beïnvloeden. Zo staat de activiteit van d4EBP (inhibitor van de translatie-initiatiefactor eIF4E) niet enkel onder controle van dTOR, maar wordt het ook gereguleerd door dAkt (via fosforylatie) en dFOXO (via transcriptie) (Miron *et al.*, 2001; Puig *et al.*, 2003). Daarnaast is er ook sprake van *feedback* regulatie van mTOR naar de insuline/IGF-1 *pathway*. Recente studies tonen aan dat mTOR signalisatie de fosforylatie van IRS-1 door S6K tot gevolg heeft, wat een negatieve impact heeft op zijn functie als activator van PI3K (Tremblay en Marette, 2001; Harrington *et al.*, 2004). Bovendien veroorzaakt de activering van de mTOR *pathway* ook een verlaagde IRS-1 expressie (Harrington *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004).

5.2.3.2 Regulatie van de levensduur

5.2.3.2.1 *S. cerevisiae* en *P. anserina*

Recente studies wijzen op een rol voor Tor1 in de regulatie van zowel de replicatieve als de chronologische levensduur in *S. cerevisiae*, en suggereren dat Tor1 betrokken is bij de respons op CR in gist. Een grootschalig onderzoek naar genen met een levensduurverlengend effect op de replicatieve levensduur van *S. cerevisiae*, identificeerde zes genen die deel uitmaken van de Tor *pathway*. De deletie van *TOR1* en van verschillende *downstream* effector genen (o.a. een stikstof-responsieve transcriptiefactor en twee componenten van de grote ribosomale subunit) veroorzaakte een verlenging van de replicatieve levensduur (Kaeberlein *et al.*, 2005). In een gelijkaardige *screen* naar genen die de levensduur van stationaire fase cellen kunnen verlengen, werden opnieuw verschillende componenten van de gist Tor *pathway* geïdentificeerd. Een gereduceerde Tor signalisatie veroorzaakte bovendien de translocatie van de stressrespons transcriptiefactor Msn2 naar de nucleus en leidde tot een verhoogde resistentie tegen warmte en oxidatieve stress (Powers *et al.*, 2006). Tor1-deficiënte cellen die onderworpen werden aan CR vertoonden geen verdere verlenging van de replicatieve levensduur, wat suggereert dat CR de levensduur beïnvloedt via de inhibitie van Tor signalisatie (Kaeberlein *et al.*, 2005).

Zeer recent werd een *TOR* gen geïdentificeerd in *P. anserina*. Net als de meeste eukaryote soorten, bezit deze schimmel slechts één enkel *TOR* gen. Omdat behandeling met de *TOR* inhibitor rapamycine een groeistop veroorzaakte, werd geconcludeerd dat *PaTOR* essentieel is (Pinan-Lucarré *et al.*, 2006). Over de rol van *PaTOR* in de regulatie van de levensduur of de respons op CR in dit organsime is tot op heden nog niets gekend.

5.2.3.2.2 *C. elegans*

De TOR *pathway* in *C. elegans* werd uitgebreid besproken in Hoofdstuk 4.3.5.3.4. Een mutatie in *let-363*, het TOR homolog in *C. elegans*, veroorzaakt een vertraagde ontwikkeling en een groeistop in het L3 stadium (Long *et al.*, 2002). Hoewel een heterozygote *let-363* mutatie geen effect had op de levensduur (Jia *et al.*, 2004), bleek *let-363* RNAi geïnitieerd vanaf het adulte stadium, de hoeveelheid eiwit voldoende te kunnen reduceren om een verlenging van de levensduur te kunnen veroorzaken (Vellai *et al.*, 2003; Henderson *et al.*, 2006). Recent studies suggereren ook dat een verminderde TOR signalisatie aan de basis ligt van de levensduurverlengende effecten van CR in *C. elegans* (Hansen *et al.*, 2007).

5.2.3.2.3 *D. melanogaster*

De TOR *pathway* in fruitvliegen speelt een belangrijke rol in de regulatie van celgroei en grootte door de beschikbare hoeveelheid voedsel (aminozuren) te koppelen aan de

activiteit van S6K, dat belangrijk is voor de biogenese van ribosomen. De TSC1 en TSC2 complexen in *Drosophila* inhiberen de transductie van deze voedsel-gerelateerde signalen naar dTOR (Zhang *et al.*, 2000; Oldham en Hafen, 2003). Net zoals *let-363*-deficiënte wormen, hebben homozygote *Drosophila TOR* mutanten een sterk vertraagde ontwikkeling en sterven de larven zonder zich te ontpoppen tot adulte vliegen (Zhang *et al.*, 2000). Zowel de overexpressie van *dTsc1* of *dTsc2*, als van een dominant-negatieve vorm van *dTOR* of *dS6K* veroorzaakte een verlenging van de levensduur. Bovendien bleek de modulatie van de TOR *pathway* in het vet lichaam hiervoor voldoende (Kapahi *et al.*, 2004). Dus, naar analogie met de insuline/IGF-1 *pathway*, reguleert de activiteit van dTOR in het vet lichaam de grootte van het organisme tijdens de ontwikkeling en vervolgens veroudering in adulte vliegen. Een hoge concentratie aan gistextract in het kweekmedium van *D. melanogaster* wordt beschouwd als het omgekeerde van CR en veroorzaakte een significante verkorting van de levensduur van wild type vliegen. De overexpressie van *dTsc2* beschermde de vliegen tegen deze negatieve gevolgen. Gelijkaardige resultaten werden bekomen met de overexpressie van de dominant-negatieve vorm van S6K. Aangezien de verlengde levensduur afhankelijk is van de nutritionele condities, suggereren de auteurs dat deze resultaten een link aantonen tussen de TOR *pathway* en CR (Kapahi *et al.*, 2004).

Hoewel bovenstaande resultaten duidelijk aantonen dat de TOR *pathway* geconserveerd is in een brede waaier aan organismen, werd tot op heden nog geen link gerapporteerd tussen mTOR signalisatie en de levensduur in zoogdieren (Wullschleger *et al.*, 2006).

5.2.4 Mitochondriale regulatie van de levensduur

5.2.4.1 *S. cerevisiae*

De *retrograde* respons in *S. cerevisiae* is een intracellulaire signalisatiecascade die geactiveerd wordt tengevolge van mitochondriale defecten. Dit resulteert in de inductie van verschillende nucleaire genen die coderen voor mitochondriale, cytoplasmatische en peroxisomale proteïnen, zoals bv. *CIT2* (peroxisomaal citraat synthase) (Liao *et al.*, 1991; Epstein *et al.*, 2001). De inductie van de *retrograde* respons werd ondermeer vastgesteld in '*petites*'. Dit zijn gistcellen die een deletie hebben in hun mitochondriaal DNA of die geen mtDNA meer bezitten. Ook een mutatie in een nucleair gen dat codeert voor een subunit van complex IV van de mitochondriale elektronentransportketen, heeft de activering van deze *pathway* tot gevolg (Kirchman, 1999). De inductie van de *retrograde* respons is in proportie met de mate van mitochondriale disfunctie en gaat gepaard met een aanzienlijke verlenging van de levensduur (Kirchman *et al.*, 1999).

Drie signalisatie proteïnen, Rtg1, Rtg2 en Rtg3, zijn verantwoordelijk voor het mediëren van de *retrograde* respons (Liao en Butow, 1993; Jia *et al.*, 1997). Rtg1 en Rtg3 vormen de subunits van een heterodimere transcriptiefactor, terwijl Rtg2 de functionele status van de mitochondriën signaleert door het Rtg1-Rtg3 complex te activeren (via defosforylatie), met de translocatie van deze transcriptiefactor naar de nucleus tot gevolg (Sekito *et al.*, 2000). De verlengde levensduur van cellen met een mitochondriale disfunctie wordt bovendien

ook onderdrukt door een deletie van het *RAS2* gen, dat betrokken is bij de coördinatie van celgroei en celdeling (Jazwinski, 1999; Kirchman *et al.*, 1999).

Tijdens het verouderingsproces in *S. cerevisiae* werd een toenemend aantal niet-functionele mitochondriën vastgesteld (Lai *et al.*, 2002). Er werd aangetoond dat deze achteruitgang van de mitochondriën gepaard gaat met de inductie van de *retrograde* respons. Bijgevolg speelt deze signalisatiecascade ook een rol in het normale verouderingsproces in deze gist (Borghouts *et al.*, 2004).

De verlengde levensduur tengevolge van CR in *S. cerevisiae* is onafhankelijk van de *retrograde* respons (Jiang *et al.*, 2000). Zo veroorzaakte CR een verlaagde expressie van *CIT2*, wat een negatieve interactie tussen beide mechanismen suggereert. Er werd ook aangetoond dat de deletie van *RTG2* de verlengde levensduur van gerestricteerde gisten niet kon onderdrukken. Een mutatie in *RTG3* tenslotte resulteerde in een additieve verlenging van de levensduur, wat opnieuw duidt op een negatieve interactie tussen beide interventies. Er werd dan ook gesuggereerd dat CR kan beschouwd worden als een preventief levensduurverlengend mechanisme in gist, terwijl de *retrograde* respons eerder een compenserend mechanisme is (Jazwinski, 2005).

5.2.4.2 *P. anserina*

P. anserina was één van de eerste organismen waarin werd aangetoond dat de mitochondriën een belangrijke rol spelen bij het verouderingsproces. Veroudering is in deze schimmel systematisch geassocieerd met mtDNA instabiliteit (Osiewacz, 2002; Lorin *et al.*, 2006). Er werd aangetoond dat een covalent gesloten, cirkelvormig DNA molecule, het plDNA of α -senDNA, accumuleert in de mitochondriën van verouderende culturen (Stahl *et al.*, 1978). Dit genetisch element is afkomstig van het eerste intron (het pl-intron) van het gen dat codeert voor de grootste subunit van cytochroom oxidase (COX, maakt deel uit van complex IV van de mitochondriale elektronentransportketen) (Osiewacz en Esser, 1984). De mitochondriën van juveniele hyfen bevatten zo goed als geen plDNA. Tijdens het verouderingsproces wordt het pl-intron systematisch vrijgesteld en geamplificeerd (intron transpositie), wat de deletie van grote delen van het mtDNA tot gevolg heeft (Belcour *et al.*, 1981). Bijgevolg wordt de meerderheid van de mtDNA moleculen intensief herschikt in verouderende culturen. Hoewel deze reorganisaties een belangrijke rol spelen in het verouderingsproces van *P. anserina*, zijn ze niet de oorzaak van veroudering, maar eerder een versneller van dit proces in wild type stammen. Dit werd aangetoond door het feit dat in verschillende langlevende mutanten, die echter nog steeds een beperkte levensduur hebben, geen accumulatie van plDNA werd waargenomen (Borghouts *et al.*, 1997; Jamet-Viorny *et al.*, 1997; Silar *et al.*, 1997). De meeste van deze mutanten worden gekarakteriseerd door een COX deficiëntie.

Een voorbeeld van zulke levensduurverlengende mutatie is deze in het *grisea* gen. Dit nucleaire gen codeert voor de transcriptiefactor GRISEA, die een rol speelt in de regulatie van de cellulaire hoeveelheden koper (Osiewacz en Nuber, 1996). Als de cellulaire koper concentratie laag is, induceert GRISEA de transcriptie van verschillende *target* genen, zoals *PaSod2* en *PaCtr3* (Borghouts *et al.*, 2001; Borghouts *et al.*, 2002). Deze laatste codeert voor

een koper transporter met hoge affiniteit. In de *grisea* mutant is de hoge affiniteit opname van koper verstoord, waardoor de toevoer van koper naar de mitochondriën en de assemblage van het koper-afhankelijke complex IV in het gedrang komen. Hoewel *P. anserina* een obligate aeroob is, is dit defect in de aanvoer van koper naar de mitochondriën toch niet lethaal. Nader onderzoek wees uit dat in de *grisea* mutant een *retrograde* respons geactiveerd wordt die compenseert voor defecten in de mitochondriale elektronentransportketen door gebruik te maken van een alternatief oxidase (AOX) (Borghouts *et al.*, 2001). Omdat het ijzer-afhankelijke AOX *upstream* van complex III gelokaliseerd is, draagt enkel complex I bij aan de opbouw van de elektrochemische potentiaal, waardoor in deze mutant de productie van ATP verlaagd is (Vanlerberghe en McIntosh, 1997). In tegenstelling tot het hoge affiniteit transport van koper, is in *grisea* mutanten het lage affiniteit transport van koper niet aangetast, waardoor deze mutanten zowel via COX als AOX respireren.

In de langlevende *ex* mutant verloopt de respiratie volledig via AOX, tengevolge van de deletie van delen van de grootste subunit van complex IV (Schulte *et al.*, 1988). Opmerkelijk is dat deze mutant geen symptomen van veroudering vertoont. Een studie met een COX deficiënte stam waarin AOX geïnduceerd werd, toonde aan dat de vorming van ROS sterk verlaagd was in vergelijking met de wild type stam die respireerde via COX (Dufour *et al.*, 2000). Recent werd aangetoond dat ook een mutatie in complex III een sterk verlengde levensduur en een verminderde ROS productie veroorzaakt (Sellem *et al.*, 2007). Bijgevolg is de levensduurverlenging niet complex-specifiek, maar een gevolg van de afwezigheid van een functionele cytochroom-afhankelijke elektronentransportketen.

Een bewijs voor een directe rol voor ROS in het proces van mtDNA destabilisatie is nog niet geleverd. Een aantal correlatieve waarnemingen suggereren echter een link tussen de levensduur en de vorming van ROS. Zo blijkt dat in mutanten met een verstoorde cytochroom oxidase *pathway* de verlaagde ROS productie steeds geassocieerd is met een verhoogde mtDNA stabiliteit en een verlengde levensduur. Het herstellen van de normale ROS concentraties in deze mutanten gaat gepaard met een verhoogde mtDNA instabiliteit en een verkorting van de levensduur. Dit suggereert dat ROS betrokken zijn bij de productie en/of accumulatie van de mtDNA reorganisaties tijdens het verouderingsproces in *P. anserina* (Lorin *et al.*, 2006).

Of het alternatief oxidase ook geïnduceerd wordt onder condities van CR in *P. anserina*, is nog niet onderzocht.

5.2.4.3 *C. elegans*

Zoals beschreven in Hoofdstuk 4.3.2, werden in *C. elegans* zowel langlevende als kortlevende mitochondriale mutanten geïdentificeerd. Alle Mit mutanten worden gekenmerkt door een tragere ontwikkeling die een gevolg is van defecten in de mitochondriale respiratie en/of een verlaagde ATP productie (Ishii *et al.*, 1998; Kayser *et al.*, 2001; Dillin *et al.*, 2002b; Lee *et al.*, 2003; Kayser *et al.*, 2004). In de kortlevende Mit mutanten is de gereduceerde levensduur geassocieerd met een verhoogde productie van

ROS en een toename in oxidatieve schade (Hartman *et al.*, 2001; Senoo-Matsuda *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2005). Of de verlenging van de levensduur in langlevende Mit mutanten een gevolg is van verminderde oxidatieve stress is niet duidelijk. In de langlevende *clk-1* mutant werd geen systematische verhoging van de SOD en catalase activiteit vastgesteld (Braeckman *et al.*, 2002a). De toename in *sod-3* expressie in de *isp-1* mutant bleek ook niet noodzakelijk voor de verlenging van de levensduur (Feng *et al.*, 2001). Deze resultaten suggereren dat de productie van ROS gereduceerd zou kunnen zijn in langlevende Mit mutanten. Of dit ook effectief het geval is, werd echter nog niet onderzocht. De *threshold* effect hypothese veronderstelt dat de balans tussen eventuele residuele ETK activiteit en de activering van compenserende *pathways* bepaalt of een Mit mutatie een verkorting dan wel een verlenging van de levensduur tot gevolg heeft (Ventura *et al.*, 2006).

De vertraagde ontwikkeling, verhoogde stressresistentie en verlengde levensduur van sommige mitochondriale *C. elegans* mutanten zijn tevens kenmerkend voor calorisch gerespecteerde wormen. Het is echter onwaarschijnlijk dat de respons op CR gemedieerd zou worden door componenten van de elektronentransportketen, aangezien beide mechanismen actief zijn tijdens verschillende stadia van de levenscyclus (Hansen *et al.*, 2005). Zo veroorzaakte de RNAi inactivering van componenten van de elektronentransportketen een verlenging van de levensduur indien RNAi exclusief tijdens de ontwikkeling geïnitieerd werd. De exclusieve inactivering van deze componenten tijdens de adulte fase had geen effect op de levensduur (Dillin *et al.*, 2002b). De nutritionele condities daarentegen, controleren de levensduur hoofdzakelijk tijdens het adulte stadium (Klass, 1977, zie ook Hoofdstuk 7.3).

5.2.4.4 *D. melanogaster*

Fruitvliegen werden tot hertoe regelmatig gebruikt in studies die de bedoeling hadden de rol van mitochondriaal geproduceerde ROS in het verouderingsproces te ontrafelen (Parkes *et al.*, 1998; Kirby *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002; Magwere *et al.*, 2006). In vergelijking met andere model organismen, zoals *P. anserina* of *C. elegans*, werd er evenwel slechts weinig onderzoek verricht naar mutaties die interfereren met mitochondriale respiratie. Zeer recent echter werd een studie gepubliceerd waarin een *Drosophila* mutant met een defect in subunit b van het succinaat dehydrogenase (complex II van de mitochondriale elektronentransportketen) gekarakteriseerd werd (Walker *et al.*, 2006). Naar analogie met de *C. elegans mev-1* mutant, is ook de *Drosophila sdhB* mutant overgevoelig voor zuurstof en heeft deze een sterk gereduceerde levensduur. Het elektronentransport ter hoogte van complex II is verstoord en dit gaat gepaard met verhoogde productie van waterstofperoxide (Walker *et al.*, 2006). Tot op heden werden geen langlevende *Drosophila* mutanten met een defecte respiratie geïdentificeerd. Of mitochondriale respiratie een rol speelt bij de respons op CR is ook nog niet onderzocht. Wel blijkt dat er in gerespecteerde vliegen alvast geen correlatie is tussen ROS productie en de verlengde levensduur (Miwa *et al.*, 2004).

5.2.4.5 Zoogdieren

De rol van respiratie en ROS-geïnduceerde schade tijdens het verouderingsproces werd recent ook onderzocht in muis mutanten (Sedensky en Morgan, 2006). De uitschakeling van het *C. elegans clk-1* homoloog *COQ7* veroorzaakte embryonale lethaliteit en de accumulatie van DMQ9 (demethoxyubiquinone 9, de precursor van Coenzyme Q₉) (Nakai *et al.*, 2001). De exogene expressie van *COQ7* in deze muizen resulteerde echter in leefbare transgenen met gereduceerde Coq7 activiteit en een lagere concentratie aan Q₉ (Nakai *et al.*, 2004). De *COQ7* mutanten hadden een gereduceerde complex II-afhankelijke respiratie en produceerden minder superoxide en waterstofperoxide. Bijgevolg concludeerden de auteurs dat de lage hoeveelheden Q₉ het elektronentransport vertragen door de activiteit van de enzymen van de ETK te reguleren ter hoogte van Q. Het vertraagde elektronentransport zou dan op zijn beurt een verminderde ROS productie tot gevolg hebben (Nakai *et al.*, 2004). In een latere studie werd vastgesteld dat *COQ7/CLK1* heterozygote muizen een verlengde levensduur hebben (Lin *et al.*, 2005).

Twee verschillende onderzoeksgroepen construeerden muizen met een puntmutatie in het *proofreading* domein van DNA polymerase- γ (POLG), dat deel uitmaakt van de katalytische subunit van het mtDNA polymerase (Trifunovic *et al.*, 2004; Kujoth *et al.*, 2005). Deze *proofreading* activiteit is essentieel voor het verhinderen van de accumulatie van mtDNA mutaties tijdens het verouderingsproces van muizen. De verminderde POLG activiteit in de 'mtDNA mutator' muizen veroorzaakte dan ook de progressieve accumulatie van puntmutaties in het mtDNA. Dit ging gepaard met vroegtijdige symptomen van veroudering en een gereduceerde levensduur. Hoewel het aantal puntmutaties in het mtDNA lineair toenam in functie van de leeftijd, vertoonden de mutator muizen geen tekenen van verhoogde ROS productie of verhoogde oxidatieve schade aan eiwitten, lipiden of DNA (Kujoth *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2005). Deze resultaten pleiten dus tegen een directe rol voor oxidatieve stress in het verouderingsproces. De mutator muizen vertoonden echter wel defecten in mitochondriale respiratie, wat suggereert dat een verstoorde oxidatieve fosforylatie het verouderingsproces zou kunnen versnellen door bepaalde cellulaire processen zoals bv. celdood te stimuleren (Kujoth *et al.*, 2005; Thompson, 2006).

Of de normale mitochondriale functie een rol speelt bij de regulatie van de respons op CR in zoogdieren is niet duidelijk. Omgekeerd blijkt de gereduceerde opname van voedsel wel een invloed te hebben op de mitochondriën. Hoewel de beschikbare data een verminderde productie van ROS onder gerespecteerde condities suggereren (Kujoth *et al.*, 2007), is het verband louter correlatief van aard. Zo blijkt CR gepaard te gaan met een vermindering van het aantal mtDNA deleties in de lever van ratten (maar niet in de hersenen) (Cassano *et al.*, 2004). Een verminderde schade aan het mtDNA zou een gevolg kunnen zijn van een verlaagde ROS productie ter hoogte van complex I (Lopez-Torres *et al.*, 2002). Een andere hypothese is dat CR tegelijk de verhoogde biogenese van mitochondriën en een efficiëntere productie van ATP tot gevolg heeft. Dit zou dan opnieuw gepaard gaan met een verminderde ROS productie (Lopez-Lluch *et al.*, 2006).

5.3 Besluit

Een groot deel van het onderzoek naar veroudering werd uitgevoerd in tal van eenvoudige modelorganismen zoals de gist *S. cerevisiae*, de schimmel *P. anserina*, de nematode *C. elegans* en de fruitvlieg *D. melanogaster*. De relatief korte levensduur van deze organismen, hun goed gekende biologie en het feit dat hun volledige genoomsequentie gekend is, zijn slechts enkele van de vele voordelen die deze organismen bieden voor de studie van veroudering. Om echter relevant te zijn voor het onderzoek naar veroudering in de mens, moeten de mechanismen die aan de basis liggen van het verouderingsproces in deze eenvoudige organismen overeenkomsten vertonen met de mechanismen van veroudering in de mens. Het is met andere woorden belangrijk om de 'private' verouderingsmechanismen, die species-specifiek zijn, te onderscheiden van de 'publieke' verouderingsmechanismen, die evolutief geconserveerd zijn in een brede waaier aan organismen (Partridge en Gems, 2002). Bovenstaande resultaten tonen aan dat verschillende signaaltransductiepaden, waaronder de insuline/IGF-1 *pathway*, sirtuïnes en TOR signalisatie, evolutief geconserveerde en dus publieke mechanismen van veroudering zijn. Ook de mitochondriën blijken een belangrijke rol te spelen in het verouderingsproces van een variëteit aan organismen. Interferentie met de activiteit van deze verschillende signaaltransductiepaden veroorzaakt in verschillende organismen een verlenging van de levensduur.

Calorische restrictie is de enige interventie die de ontwikkeling van ouderdomsgerelateerde ziekten vertraagt en een robuuste verlenging van de levensduur veroorzaakt in een variëteit aan organismen, waaronder zoogdieren. Gezien de meervoudige effecten van een gereduceerde voedselopname, is het mechanisme dat aan de basis ligt van de levensduurverlenging tengevolge van CR nog steeds onderwerp van discussie. Een vergelijkende studie die de bedoeling had om het geconserveerde karakter van calorische restrictie te onderzoeken, toonde aan dat hoewel individuele genen verschillend beïnvloed werden door CR in verschillende organismen, de globale fysiologische respons tengevolge van CR wel soortgelijk was. Bepaalde processen, zoals energie metabolisme, stress en immuun respons, celgroei en regulatie van transcriptie werden systematisch op eenzelfde wijze beïnvloed door CR in verschillende organismen (Han en Hickey, 2005). Anderzijds blijkt de insuline/IGF-1 *pathway* een rol te spelen bij de respons op CR in *S. cerevisiae* en *D. melanogaster*, maar niet in *C. elegans*. De resultaten in zoogdieren zijn alsnog tegenstrijdig. Voorlopig werd enkel in *D. melanogaster* ondubbelzinnig aangetoond dat sirtuïnes betrokken zijn bij de respons op CR. De betrokkenheid van de TOR *pathway* in de respons op CR werd reeds aangetoond in *S. cerevisiae* en *C. elegans*. De resultaten in *Drosophila* zijn echter niet zeer overtuigend en bewijs ontbreekt nog voor zoogdieren. Vooralsnog werd in geen enkel organisme een duidelijke rol aangetoond voor mitochondriale regulatie van de respons op CR. Bovendien is nog niet bewezen dat CR ook de levensduur van langlevende soorten zoals apen, kan verlengen. Ook is in geen enkel organisme ondubbelzinnig aangetoond of de verlengde levensduur tengevolge van een verminderde voedselopname veroorzaakt wordt door de gereduceerde opname van calorieën of door een verminderde opname van één of meer specifieke nutriënten. Dit alles suggereert dat de respons op CR gedeeltelijk species-specifiek zou kunnen zijn.

6 Materiaal en methoden

6.1 Gebruikte stammen en media

In het laboratorium wordt *C. elegans* gewoonlijk gekweekt op vaste voedingsbodems met een laagje *E. coli*. De stam die het meest gebruikt wordt, is OP50, een stam die afgeleid is van de wild type stam K12 (Kayser *et al.*, 2004). Aangezien OP50 auxotroof is voor uracil groeit hij slechts traag, wat op agarplaten aanleiding geeft tot een dun laagje bacteriën. In dit werk wordt echter meestal de K12 stam gebruikt. Deze groeit veel sneller en vergemakkelijkt daardoor de kweek van grote hoeveelheden wormen. Bacteriële culturen worden bekomen door enten van een kleine hoeveelheid *E. coli* in LB medium (0.8% trypton, 0.4% gistextract en 0.4% NaCl) en overnacht incuberen in een schudder bij 37°C. Voor het kweken van grote hoeveelheden wormen worden nutriënt-agarplaten gebruikt (Oxoid, Hampshire, Engeland: 0.1% 'Lab Lemco' poeder, 0.2% gistextract, 0.5% pepton, 0.5% NaCl en 1.5% agar, 0.0005% cholesterol toevoegen, 25 mM K-fosfaat buffer pH 6 toevoegen na autoclaveren) met daarop een laagje *E. coli* cellen die overnacht gegroeid worden bij 37°C. De nematoden worden vervolgens op deze platen gebracht en geïncubeerd bij de gewenste temperatuur.

Andere media die gebruikt worden voor het kweken van wormen zijn NGM (*Nematode Growth Medium*) en agar n°1 platen en axenisch medium. NGM platen (0.3% NaCl, 1.7% agar, 0.25% soja pepton en 0.0005% cholesterol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄ en 25 mM K-fosfaat buffer pH 6 toevoegen na autoclaveren) worden standaard gebruikt in de meeste *C. elegans* laboratoria. Agar n°1 platen bestaan uit 2% agar met spore-hoeveelheden cholesterol en 25 mM K-fosfaat buffer pH 6 (toegevoegd na sterilisatie). Deze platen bevatten bijgevolg geen nutriënten. Axenisch medium is een steriel medium (zonder bacteriën) en bestaat uit 3% (w/v) soja pepton (bron van aminozuren) en 3% (w/v) gistextract (bron van vitaminen en groeifactoren). Aangezien *C. elegans* niet in staat is om zelf haem te synthetiseren, wordt 0.05% haemoglobine (100x stockoplossing in 0.1 N KOH, 10 min autoclaveren) toegevoegd na autoclaveren van het basaal medium. Hoewel axenisch medium een rijk kweekmedium is waarin bacteriën ongebreideld kunnen groeien, hebben de wormen een supplement nodig om aan een normaal tempo te kunnen ontwikkelen. Gewoonlijk wordt 20% magere melk (http://usacehr.org/cehr_medium.htm) of vers leverextract toegevoegd om de ontwikkeling van *C. elegans* in vloeibaar axenisch medium te versnellen. Leverextract wordt bereid door verse lever (bv. van paard) te versnijden in kleine blokjes en te homogeniseren in een mixer in een gelijke hoeveelheid gedestilleerd water. Het homogenaat wordt vervolgens gecentrifugeerd (30 min, 18 000 rpm) en het supernatans gesteriliseerd door filtratie met Seitz filters (Sayre *et al.*, 1963).

Om contaminatie met juvenielen te vermijden, worden wormen net voor het bereiken van het adulte stadium behandeld met FUdR (5-fluoro-2'-deoxyuridine) zoals voorgesteld door Erlanger en Gershon (1970). Deze chemische stof verhindert reproductie door het blokkeren van de celdeling (competitieve inhibitor van thymidilaat synthase), maar heeft geen invloed

op de levensduur van *C. elegans* (Vanfleteren en Braeckman, 1999). Standaard wordt 50 μM FUDR toegevoegd aan *C. elegans* culturen waar de wormen gekweekt worden op bacteriën die niet kunnen delen. Omdat prolifererende bacteriën in staat zijn om FUDR af te breken, wordt aan wormen die op deze bacteriën groeien, een hogere dosis FUDR toegevoegd. Indien de bacteriële voedingsbron enkel tot een beperkt aantal delingen in staat is (bv. na behandeling met een antibioticum), wordt 100 μM FudR gebruikt. Wormen die gekweekt worden op levende bacteriën zonder toevoegingen, worden behandeld met 200 μM FUDR.

Tabel 6.1 geeft een overzicht van de verschillende *C. elegans* stammen die in dit werk gebruikt worden.

Stam	Beschrijving
N2 (CGC male stock)	Wild type hermafrodieten (Gems en Riddle, 2000a)
<i>eat-1(ad427)</i>	Defecte voeding, trage en onregelmatige faryngeale pompbewegingen
<i>eat-2(ad1116)</i>	Defecte voeding, trage faryngeale pompbewegingen
<i>eat-6(ad467)</i>	Defecte voeding, verstoorde faryngeale spierrelaxatie
<i>fer-15(b26ts)</i>	Temperatuursensitief voor spermatide activering
<i>glp-4(bn2)</i>	Temperatuursensitief voor geslachtsceelproliferatie
<i>glp-4(bn2);daf-16(mgDf50)</i>	Temperatuursensitief voor geslachtsceelproliferatie en Daf-d

Tabel 6.1: Overzicht van de gebruikte *C. elegans* stammen.

6.2 Invriezen van nematoden

C. elegans kan gedurende een langere termijn bewaard worden in vloeibare stikstof (Sulston en Hodgkin, 1988), waardoor grote hoeveelheden stammen kunnen bewaard worden. Het continue (en arbeidsintensieve) opkweken is dus niet langer noodzakelijk en bovendien wordt genetische drift vermeden.

Na het overbrengen van wormen naar S-buffer wordt een gelijk volume *freezing solution* (30% glycerol (w/v) in S-buffer) toegevoegd en worden 1 ml volumes van de nematodensuspensie overgebracht naar Nalgene buisjes. Deze worden ingevroren bij -75°C in een recipient dat isopropylalcohol bevat, waardoor de temperatuur daalt met ongeveer $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Eenmaal ingevroren worden de stalen overgebracht naar vloeibare stikstof. Het ontvriezen van stalen moet zeer snel gebeuren. 500 μl fracties worden vervolgens uitgespreid op agar n°1 platen zonder bacteriën. De platen worden geïncubeerd bij kamertemperatuur en na enkele uren geïnspecteerd op beweging. De volgende dag worden overlevende wormen getransfereerd naar platen met *E. coli*. Hoewel het overlevingspercentage na cryopreservatie gewoonlijk laag is, herstellen in het algemeen toch voldoende wormen om een nieuwe cultuur op te starten.

6.3 Synchrone wormpopulaties bekomen

Synchrone wormpopulaties worden bekomen door gravide adulten te behandelen met een mengsel van NaOH en bleekwater (Sulston en Hodgkin, 1988; Vanfleteren en De Vreese, 1996), waardoor de wormen lyseren, maar de eitjes intact blijven. Wormen met eieren worden daartoe van de agarplaten gespoeld en twee maal gewassen met S-buffer (0.1 M NaCl, 0.05 M kalium fosfaat buffer, pH 6). Na het verwijderen van het supernatans wordt water toegevoegd met 20% bleekwater (finale concentratie van 1.6%) en 0.5 N NaOH, waarna de stalen gedurende 4.5 min geschud worden. Na centrifugeren (2 min, 3000 rpm, 4°C) en verwijderen van het supernatans worden de eieren drie maal gewassen met S-buffer. Tenslotte worden ze overnacht geïncubeerd in een schudder bij 20°C. De wormen zullen uit het ei sluipen en door de afwezigheid van voedsel hun ontwikkeling stopzetten in het L1 stadium. Om problemen met steriliteit te voorkomen, vooral bij axenische cultuur, wordt de procedure gewoonlijk nog eens herhaald. Deze keer worden de stalen echter slechts één minuut geschud. Op die manier lossen de overblijvende wormen toch nog op en worden residuele bacteriën gedood, met een beperkte doding van het aantal kiembare eieren.

6.4 Procedures voor *C. elegans*

De procedures voor *C. elegans* die in dit werk gebruikt werden, kunnen onderverdeeld worden in twee groepen. Zo werd in de Hoofdstukken 7.1, 7.2, 7.3 en 7.4 voornamelijk gekeken naar het effect van voedselconcentratie of -supplement op verschillende aspecten van de biologie van *C. elegans*. De levensduur, de fertiliteit en het lichaamsvolume van de wormen werd daarbij telkens onderzocht. In de Hoofdstukken 7.5 en 7.6 werden een aantal fysiologische en enzymatische testen gebruikt die de bedoeling hadden een indicatie te geven van de metabole toestand en de stressresistentie van *C. elegans*.

6.4.1 Biologische variabelen

6.4.1.1 Bepaling van de levensduur

De levensduur wordt bepaald door de overleving van een 100-tal synchrone hermafrodieten op regelmatige tijdstippen op te volgen. Bij gebruik van vaste voedingsbodems worden wormen overgebracht naar kleine Petriplaten (Ø 5.5 cm) met FUDR vlak voor ze het adulte stadium bereiken. Deze dag wordt gedefinieerd als dag 0. Gewoonlijk worden 6 à 10 wormen samen op 1 plaatje gebracht. Omdat de levensduur van *C. elegans* bepaald wordt in functie van de beschikbare hoeveelheid voedsel, is het belangrijk dat de concentratie aan *E. coli* op de platen niet toeneemt. Hiervoor worden verschillende benaderingen gebruikt. Axenische platen worden voorzien van een laagje bestraalde *E. coli* (zie verder). Hoewel deze bacteriën nog in leven zijn, kunnen ze niet meer delen. Onder deze omstandigheden wordt 50 µM FUDR gebruikt. Door de afwezigheid van nutriënten in agar n°1 platen,

volstaat het om hier gewassen bacteriën te gebruiken. Ook hier wordt 50 μM FUDR toegevoegd. Aan de NGM platen worden bestraalde of carbenicilline-behandelde (zie verder) bacteriën toegevoegd. Wormen die gekweekt worden op carbenicilline-behandelde bacteriën worden behandeld met 100 μM FUDR. Indien de overleving opgevolgd wordt in vloeibaar medium, worden jong-adulte wormen overgebracht naar buisjes met 300 μl axenisch medium met 50 μM FUDR waaraan een geschikt supplement toegevoegd werd (magere melk of vers leverextract). Wormen die onder standaard condities (NGM + onbehandelde OP50) gekweekt worden, worden behandeld met 200 μM FUDR. Per tijdstip worden de levende, dode en verdwenen wormen geteld. De nematoden worden als dood beschouwd als ze niet meer reageren op aanraking met een platinum draad of na tikken tegen het buisje.

6.4.1.2 Bepaling van de fertiliteit

De bepaling van de fertiliteit van *C. elegans* in functie van de beschikbare hoeveelheid voedsel wordt uitgevoerd op dezelfde vaste media die in de vorige paragraaf beschreven werden. Individuele wormen worden op afzonderlijke platen gebracht alvorens ze eitjes beginnen te leggen. Vervolgens worden ze om de twee dagen naar verse platen getransfereerd om de vermenging van verschillende generaties te vermijden. De ontwikkelende nakomelingen worden vervolgens geteld. Onder gunstige omstandigheden (20°C en goed gevoed met OP50) produceert *C. elegans* ongeveer 280 nakomelingen (Klass, 1977).

6.4.1.3 Bepaling van wormvolumes

De wormen worden van de platen gespoeld, drie maal gewassen met S-buffer en gedood in verdund bleekwater. Vervolgens worden de stalen één voor één overgebracht naar een *RapidVue Particle Analysis System* (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Dit toestel werd ontworpen voor de analyse van de grootte en de vorm van een variëteit aan partikels. Het *RapidVue* systeem maakt gebruik van een snelle stroboscopische lamp (0.5 μs) om beelden van partikels op te nemen die vervolgens geprojecteerd worden op een CCD sensor. Beelden afkomstig van de sensor worden gedigitaliseerd en geanalyseerd aan een snelheid van 20 tot 30 opnames per seconde. Dit betekent dat elk beeld bestaat uit een verzameling projecties van partikels. De apparatuur wordt zodanig ingesteld dat enkel partikels met welbepaalde lengte en breedte als een worm herkend worden. Schuine projecties worden bijgevolg genegeerd. De beeldanalyse *software* bepaalt de lengte en breedte van elke dwarsdoorsnede en zet de waarden om in de gewenste grootheden. Verschillende types grootheden zijn beschikbaar. In dit geval worden de wormen beschouwd als cilindervormig en worden bijgevolg de lengte en de breedte geregistreerd. De volumes worden vervolgens berekend aan de hand van de formule van een cilinder ($V = \pi \times r^2 \times h$, met r de straal en h de hoogte).

6.4.2 Fysiologische en enzymatische testen

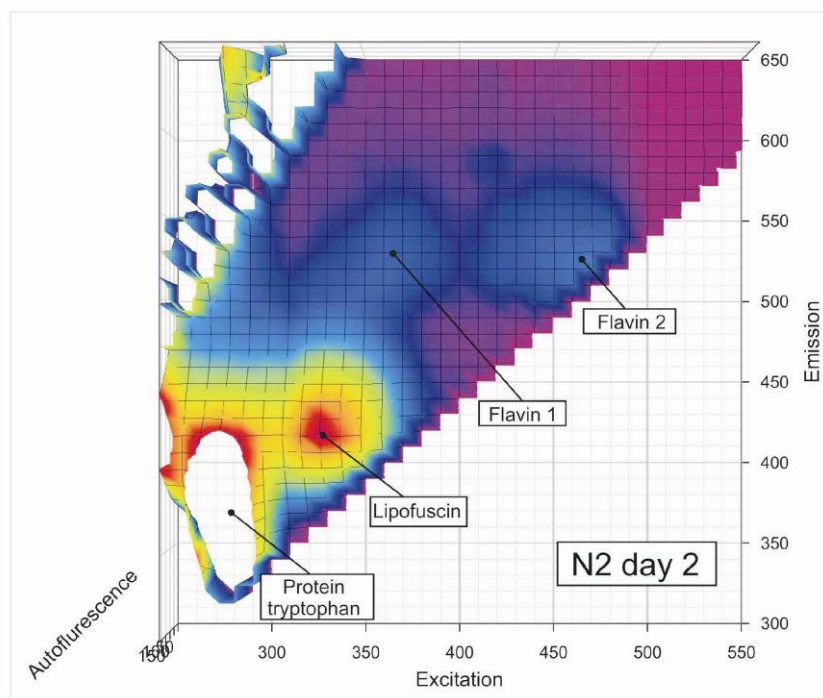
6.4.2.1 Bereiding van wormhomogenaten

De wormen worden gehomogeniseerd in een Mini-beadbeater (Biospec products, Bartlesville, USA). 2 ml microcentrifugeerbuisjes met daarin gelijke hoeveelheden worm-suspensie (100 µl), glaspereels (100 mg, 0.249 – 0.318 µm) en 50 mM Na/K fosfaat buffer pH 7.8 (100 µl), worden gedurende 1 min geschud aan 5000 rpm. Vervolgens wordt 1% Chaps (finale concentratie) toegevoegd en worden de stalen gedurende 15 min geïncubeerd op ijs. Na 8 min centrifugeren aan 14 000 rpm bij 4°C wordt het supernatans overgebracht naar een vers buisje. Een tweede centrifugatiestap is nodig om een volledig helder homogenaat te verkrijgen.

6.4.2.2 Meting van de autofluorescentie

Lipofuscines, ook verouderingspigmenten genoemd, accumuleren met toenemende leeftijd in een variëteit aan diersoorten, waaronder *C. briggsae* (Epstein *et al.*, 1972) en *C. elegans* (Klass, 1977; Hosokawa *et al.*, 1994). Dit materiaal zendt blauwe (420 - 470 nm) fluorescentie uit (B1) indien het bestraald wordt met golflengtes tussen 340 - 370 nm. Andere componenten, zoals gereduceerde nicotinamide cofactoren, hebben echter een gelijkaardige excitatie- (350 nm) en emissie- (450 nm) golflengte en ook hier stijgt de fluorescentie-intensiteit met toenemende leeftijd (Davis *et al.*, 1982). Na toevoegen van glutathion en glutathion reductase aan het reactiemengsel om het aanwezige NADH op te gebruiken, bleek dat de fluorescentie afkomstig van NADH slechts in beperkte mate bijdroeg aan het signaal (Houthoofd, 2003). Geoxideerde flavines (F2) accumuleren ook met stijgende leeftijd in *C. elegans* en deze fluorescentie wordt gemeten bij 540 - 560 nm na excitatie met golflengtes tussen 370 – 380 nm (Davis *et al.*, 1982). Uit figuur 6.1 blijkt dat lipofuscines en geoxideerde flavines duidelijk gescheiden fluorescentiepieken hebben.

De bepaling van de B1 en F2 autofluorescentie werd uitgevoerd op 50 µl wormhomogenaat en de metingen werden uitgevoerd in een *Victor² Multilabel Counter* (Perkin Elmer, Wellesley, USA) bij 25°C (Braeckman *et al.*, 2002b).



Figuur 6.1: Autofluorescentiespectrum in functie van excitatie en emissie van een homogenaat van 2-dagen-oude wild type wormen. Elke kleur in dit spectrum komt overeen met een bepaalde fluorescentie-intensiteit. Deze stijgt van paars, over blauw en geel tot rood. De tryptofaanpiek stelt de bulk hoeveelheid eiwitten voor. De lipofuscinepiek is een maat voor de hoeveelheid verouderingspigment. Flavin 1 en 2 (F1 en F2) zijn de geoxideerde flavoproteïnen (FMN en FAD). Omdat de F1-piek gedeeltelijk overlapt met de lipofuscine-autofluorescentie, wordt enkel F2 bestudeerd.

6.4.2.3 Bepaling van de ATP-concentratie

Het ATP-gehalte van wormen is een maat voor de onmiddellijk beschikbare hoeveelheid energie en wordt bepaald aan de hand van de luciferine/luciferase test (Roche Diagnostics, Basel, Zwitserland). Het ATP aanwezig in de stalen drijft de reactie van luciferine met zuurstof in aanwezigheid van luciferase:



De hoeveelheid licht die daarbij uitgezonden wordt is recht evenredig met de concentratie ATP in de wormen.

De assay wordt uitgevoerd zoals eerder beschreven (Braeckman *et al.*, 2002b). De stalen voor ATP-bepaling (100 µl) worden van de diepvriezer (-75°C) rechtstreeks naar kokend water overgebracht en gedurende 15 min gekookt om de ATPase activiteit te vernietigen. Tegelijk wordt ook het aanwezige ATP uit de wormen vrijgesteld. Vervolgens worden de stalen verdund door toevoegen van 1 ml gedestilleerd water en gecentrifugeerd gedurende 5 min aan 14 000 rpm om de wormen te verwijderen. Per staal wordt 200 µl van het supernatans overgebracht naar een vers buisje (op ijs) voor het maken van 100-voudige

verduunningen. 50 μ l fracties van een ATP-verduunningsreeks (10 pM – 1 μ M) of verdund staal worden vervolgens gepipetteerd in een 96-well plaat. Gelijke volumes luciferasereagens, gemaakt volgens de instructies van de fabrikant, worden toegevoegd, waarna de lichtproductie gemeten wordt in de *Victor² Multilabel Counter* bij 25°C over een periode van 60 min. De gemiddelde lichtintensiteit gemeten over een periode van 30 min (na aftrek van de eerste 10 min voor het elimineren van de eerste, minder nauwkeurige meetpunten), wordt gebruikt voor de berekening van de ATP-concentratie.

6.4.2.4 Bepaling van de lichtproductiepotentiaal

Een klein gedeelte (\pm 0.1%) van de verbruikte zuurstof wordt tijdens de mitochondriale respiratie omgezet tot superoxide (Fridovich, 2004). Daarnaast dragen ook andere cellulaire systemen in onbekende mate bij tot de vorming van superoxide.

De reactie van superoxide met endogeen gereduceerd lucigenine gaat gepaard met de productie van licht (Faulkner en Fridovich, 1993). Deze lichtproductie wordt vaak gebruikt voor het kwantificeren van de vorming van superoxide door gestimuleerde macrofagen (Williams en Cole, 1981). Levende wormen produceren echter geen licht, vermoedelijk omdat het lucigenine niet opgenomen wordt, maar doen dit wel na invriezen en weer ontdooien. Omdat de mitochondriën in ingevroren weefsels slechts beperkte energiereserves hebben, zullen ze geen constante hoeveelheden superoxide produceren. Dit probleem wordt opgelost door toevoegen van NADH en NADPH (samen aangeduid als NAD(P)H) aan het reactiemengsel. NADH wordt verondersteld het elektronentransport over de mitochondriale membranen te voeden, terwijl NADPH preferentieel gebruikt wordt door andere cellulaire systemen. In de aanwezigheid van NAD(P)H wordt de superoxideproductie enkel bepaald door de snelheidsconstante van het syntheseproces en dus is de hoeveelheid lucigenine-gemedieerde luminescentie een maat voor de potentiële metabole activiteit van de wormen vlak voor het invriezen. Deze parameter wordt dan ook aangeduid met de termen lichtproductiepotentiaal (LPP) of metabole capaciteit. Om te vermijden dat een deel van het gevormde superoxide wegreageert door toedoen van SOD activiteit, wordt KCN aan het reactiemengsel toegevoegd. Op die manier wordt Cu/ZnSOD efficiënt geïnhibeerd. MnSOD is ongevoelig voor cyanide, maar de activiteit van dit enzym is slechts zeer laag (Vanfleteren, 1993) en het diffundeert waarschijnlijk weg uit de mitochondriën tijdens het proces van invriezen en ontdooien. KCN inhibeert ook cytochroomoxidase in complex IV van de mitochondriale elektronentransportketen, waardoor de superoxideproductie bevorderd wordt.

De *assay* wordt uitgevoerd zoals eerder beschreven (Braeckman *et al.*, 2002b). Een stricte standaardisatie is noodzakelijk omdat de LPP-test zeer gevoelig is voor veranderingen in de experimentele condities (aantal vries/dooicycli, tijd nodig voor ontdooien, temperatuur). De stalen (200 μ l) worden één keer ingevroren en weer ontdooid door 3 min te incuberen in een waterbad op kamertemperatuur. Vervolgens worden de stalen gedurende 135 min bewaard bij 4°C, waarna 15 μ l fracties overgebracht worden naar een witte 96-well plaat. 75 μ l reactiemengsel, bestaande uit 0.1 mM lucigenine, 0.2 mM NADH, 0.2 mM NADPH, 5 mM KCN, 0.1 mM Na₂EDTA en 50 mM K-fosfaat buffer (pH 7.8), wordt toegevoegd. De

lichtemissie wordt bij 25°C gemeten in de *Victor² Multilabel Counter*, over een periode van 60 min. De LPP wordt uitgedrukt in *counts* per uur en per mg eiwit.

6.4.2.5 Bepaling van de aconitase activiteit

Aconitase katalyseert de omzetting van citraat naar isocitraat in de Krebscyclus. Verscheidene rapporten tonen aan dat dit enzym zeer gevoelig is voor oxidatieve beschadiging (Gardner en Fridovich, 1991; Yan *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2001). Gezien de mogelijke betrokkenheid van reactieve zuurstofradicalen (ROS) in het verouderingsproces, zou een daling van de aconitase activiteit met stijgende leeftijd een maat kunnen zijn voor een toenemende oxidatieve beschadiging. De activiteit van het enzym wordt bepaald door de snelheid te meten waarmee oxoglutaraat gevormd wordt uit citraat in aanwezigheid van een overmaat isocitraat dehydrogenase (ICDH). Deze reactie gaat gepaard met de reductie van NADP⁺.

De aconitase activiteit wordt bepaald zoals eerder beschreven (Houthoofd, 2003). 5 µl fracties van een wormhomogenaat worden overgebracht naar een 96-well plaat. Vervolgens wordt 200 µl reactiemengsel, bestaande uit 5 mM citraat, 1 mM MnSO₄, 0.75 mM NADP⁺ en 0.5 u/ml ICDH in 25 mM TrisHCl pH 7.5, toegevoegd. De plaat wordt gemeten bij 340 nm en 25°C in de *Victor² Multilabel Counter*. De snelheid van NADPH productie wordt berekend aan de hand van de snelheid waarmee de absorbantie bij 340 nm verandert.

6.4.2.6 Bepaling van de catalase activiteit

Waterstofperoxide of H₂O₂ ontstaat voornamelijk door de activiteit van SOD en in de peroxisomen tengevolge van de vetzuuroxidatie. Het belangrijkste enzym dat instaat voor de verwijdering van H₂O₂ is catalase. *C. elegans* bezit drie catalasen (Taub *et al.*, 1999; Petriv en Rachubinski, 2004). CTL-1 en CTL-3 zijn cytoplasmatisch, terwijl CTL-2 voorkomt in de peroxisomen.

De totale catalase activiteit wordt bepaald zoals eerder beschreven (Aebi, 1984) en is gebaseerd op de afname in absorptie bij 240 nm tengevolge van de ontbinding van H₂O₂ tot water en zuurstofgas. Het wormhomogenaat wordt verdund in 50 mM Na/K fosfaat buffer pH 7.0 met 1% Chaps. De verdunningsfactor varieert van 1/1 tot 1/20 (ongeveer 0.1 mg eiwit per 100 µl staal), afhankelijk van de enzymactiviteit. Bij de start van de reactie moet de absorptie tussen 0.60 en 0.55 liggen. 6.9 µl fracties van de homogenaat verdunning worden overgebracht naar een 96-well microtiterplaat. Aan elke well wordt 200 µl van een 10 mM H₂O₂ oplossing toegevoegd. De meting neemt ongeveer 5 min in beslag en gaat door bij 25°C. 1 unit catalase ontbindt 1 µmol H₂O₂ per minuut.

6.4.2.7 Meten van het eiwitgehalte

Omdat niet alleen de activiteit van bepaalde enzymen, maar ook de lichaamsmassa van wormen kan veranderen in functie van de leeftijd en de beschikbare hoeveelheid voedsel,

moeten bij kwantitatieve vergelijkingen tussen verouderende reeksen of tussen verschillende voedingsgroepen, de experimentele data genormaliseerd worden. De colorimetrische BCA (bicinchoninic acid) methode wordt gebruikt om de metingen te correleren aan eiwitgehalte. Tijdens deze procedure worden eiwitten behandeld met een base (NaOH), wat resulteert in de expositie van peptidebindingen. Cu^{2+} aanwezig in het BCA reagens wordt gereduceerd door reactie met deze bindingen, waarna het gevormde Cu^+ -BC gemeten wordt.

Het eiwitgehalte wordt gemeten zoals eerder beschreven (Braeckman *et al.*, 2002). De stalen (100 μl) worden overnacht gedroogd in een *Savant Speed Vac Concentrator*, waarna 180 μl NaOH aan de droge pellets toegevoegd wordt. De aanwezige vetten worden afgebroken door gedurende 25 min te verwarmen bij 70°C. Vervolgens worden de stalen verdund door toevoegen van 1.620 ml gedistilleerd water. Na vortexen en centrifugeren (5 min, 14000 rpm) worden 10 μl -porties van het supernatans in een 96-well microtiterplaat gepipetteerd. 200 μl BCA reagens dat bereid werd volgens de instructies van de fabrikant wordt aan elke well toegevoegd. Een verdunningsreeks van BSA (*Bovine Serum Albumine*, gemaakt in 0.1 N NaOH) wordt gebruikt als ijklijn. De microtiterplaat wordt afgedekt met *tape* en gedurende 1 h geïncubeerd bij 37°C. De absorbantie wordt vervolgens gemeten bij 560 nm in de *Victor² Multilabel Counter*.

6.5 Procedures voor *E. coli*

Ook de procedures voor *E. coli* kunnen onderverdeeld worden in twee groepen. Enerzijds zijn er de methoden die gebruikt werden om de concentratie aan bacteriën onder de verschillende kweekcondities onder controle te houden (Hoofdstukken 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 en 7.5). Anderzijds zijn er de methoden die gebruikt werden om de metabole activiteit van *E. coli* te onderzoeken (Hoofdstuk 7.1).

6.5.1 Inhibitie van bacteriële groei

6.5.1.1 Bestraling

Steriele *E. coli* culturen worden bekomen door de bacteriën te bestralen met elektronen. De bestraling van de stalen wordt uitgevoerd met de 15 MeV, hoog vermogen lineaire elektronenversneller (Mondelaers *et al.*, 1996) van de Gentse Universiteit (vakgroep Subatomaire en Stralingsfysica). Deze versneller kan elektronen versnellen tot elke gewenste specifieke energie tussen 3 en 15 MeV en heeft een maximaal gemiddeld bundelvermogen dat vandaag de dag ongeveer 5 kW bedraagt bij een bundelenergie van 10 MeV. Voor de bestralingen in dit werk werd een elektronenbundel met een energie van 10 MeV en een gemiddelde stroomsterkte van ongeveer 75 μA geproduceerd. Bij het verlaten van de versneller doorkruist de elektronenbundel een water-gekoeld 'uitgangsvenster' (dat het vacuüm in de accelerator scheidt van de omgevingslucht), waarin de elektronen een gedeelte van hun energie verliezen (gemiddeld ongeveer 2 MeV).

Bijgevolg bedraagt de gemiddelde energie van de elektronen die de stalen raken ongeveer 8 MeV. Bovendien wordt de oorspronkelijk parallelle bundel met een diameter van 1 cm via verstrooiing in het uitgangsvenster 'uitgewaaierd'. Naarmate de afstand voorbij het uitgangsvenster toeneemt wordt de elektronenbundel breder. Op een afstand van een 80-tal cm kunnen stalen van ongeveer 400 cm² met een oppervlakte loodrecht op de bundelrichting vrij homogeen bestraald worden. Een bestraling tot 10 kGy neemt ongeveer 150 s in beslag. Absolute dosiscalibratie wordt uitgevoerd met *Far West Technology* dosimeters die gecalibreerd worden t.o.v. ijzersulfaat (Fricke) dosimeters.

Vers gekweekte bacteriën worden gewassen, geresuspendeerd in S-buffer en overgebracht naar platte cultuurflesjes (25 cm²) met een diepte van slechts 1.8 mm. *E. coli* stocks zijn steriel als ze bestraald worden met een dosis van minstens 2 à 5 kGy. De culturen worden na bestraling gedurende maximaal 2 weken bewaard bij 4°C. Tijdens deze periode is er slechts een beperkte achteruitgang van de metabole activiteit (gemeten als zuurstofverbruik).

6.5.1.2 Carbenicilline behandeling

In sommige experimenten wordt carbenicilline gebruikt in plaats van bestraling om bacteriële groei te stoppen (protocol bekomen van Glenda Walker, UCL, Londen). Carbenicilline interfereert met de synthese van de celwand en bijgevolg zullen bacteriën die met dit antibioticum behandeld werden na enkele celdelingen hun proliferatie stopzetten.

Aan de te gebruiken voedingsbodems wordt na autoclaveren 1 mM carbenicilline toegevoegd (finale concentratie). Twee dagen vóór het gebruik van de platen worden vers gekweekte bacteriën verdund tot 3x10⁹ cellen/ml in S-buffer met 0.5 mM carbenicilline. De bacteriën worden gedurende 3h geïncubeerd in een schudincubator bij 37°C. Vervolgens worden ze gecentrifugeerd, aan de gewenste concentratie geresuspendeerd in S-buffer en uitgestreken op de agarplaten.

6.5.2 Bepaling van viabiliteit en metabole activiteit

6.5.2.1 Viabiliteitskleuring

De LIVE/DEAD® *BadLight™ Bacterial Viability Kit* (Molecular Probes) wordt gebruikt om de viabiliteit van de bestraalde bacteriën na te gaan. Deze kit maakt gebruik van een mengsel van SYTO® 9 groen en propidiumiodide om levende en dode bacteriën van mekaar te onderscheiden. De kleurstoffen zijn beide specifiek voor nucleïnezuren, maar verschillen in hun spectrale eigenschappen en hun mogelijkheid om levende cellen binnen te dringen. SYTO® 9 kleurt alle cellen in een populatie, ongeacht het al dan niet intact zijn van hun membranen, wat resulteert in groene fluorescentie. Propidiumiodide kan enkel in cellen met beschadigde membranen binnendringen en maskeert daar de SYTO® 9 fluorescentie. Levende bacteriën zullen daarom groen kleuren, terwijl dode cellen rood zullen fluoresceren.

Bacteriën worden eerst gewassen met 0.85% NaCl (w/v) en verdund tot een concentratie van 1×10^8 bact/ml. Gelijke volumes SYTO[®] 9 en propidiumiodide worden samengevoegd en 3 µl van dit mengsel wordt toegevoegd aan elke ml bacteriën. De stalen worden gedurende 15 min in het donker geïncubeerd bij kamertemperatuur. Vervolgens worden preparaten gemaakt die bekeken worden onder de fluorescentiemicroscoop met een standaard fluoresceïne *longpass* filterset. Deze maakt het mogelijk om simultaan levende en dode bacteriën te bekijken.

6.5.2.2 Bepaling van het zuurstofverbruik

De meting van de zuurstofconsumptie door bacteriën wordt hoofdzakelijk uitgevoerd zoals eerder beschreven voor *C. elegans* (Braeckman *et al.*, 2002b). De 6-kanaalsrespirometer van Strathkelvin (Glasgow, Schotland) met Clark-type elektroden wordt hiervoor gebruikt. Het toestel bestaat uit een gethermostatiseerd waterbad (37°C) met 6 respirometercellen die voorzien zijn van een magnetische roerder. Voor de calibratie van de elektroden wordt een luchtstroom gedurende 5 min doorheen gedistilleerd water van 4°C geleid. 1 ml van dit zuurstof-verzadigde water wordt overgebracht naar de cellen en gedurende 5 min geroerd om de temperatuur in de cellen te laten stijgen tot 37°C en de overmaat aan zuurstof te laten ontsnappen. Vervolgens worden de elektroden ingebracht en wordt de zuurstofconcentratie ingesteld op 214 µmol/l (=100%). Tenslotte wordt het water vervangen door 1 ml bacteriën in LB medium (4×10^8 bact/ml) en wordt het zuurstofverbruik gedurende 10 tot 30 min geregistreerd, afhankelijk van de snelheid van de zuurstofconsumptie. De zuurstofconcentratie wordt in grafiek uitgezet ten opzichte van de tijd en de richtingscoëfficiënt van het lineaire deel van de grafiek wordt gebruikt om de snelheid van het zuurstofverbruik af te leiden.

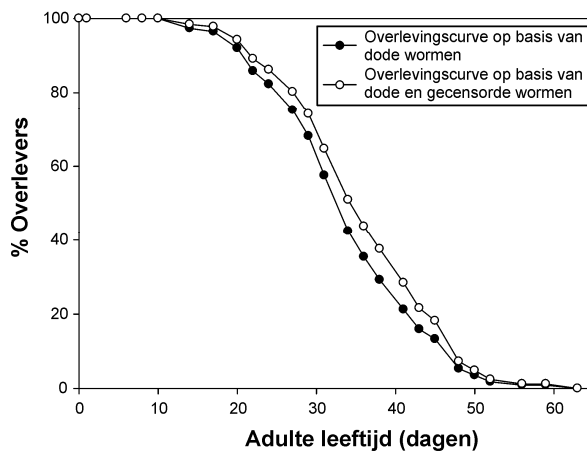
6.5.2.3 Bepaling van de warmteproductie

Er werd aangetoond dat de snelheid van warmteproductie een maat is voor de snelheid van katabole processen en dat deze productie die van het totale metabolisme benadert (Kemp en Guan, 1997). De meting van de metabole warmteproductie van levende cellen of weefsels gebeurt het meest accuraat via microcalorimetrie en wordt uitgevoerd zoals eerder beschreven voor *C. elegans* in een *Thermal Activity Monitor* (Thermometric, Järfälla, Sweden) (Braeckman *et al.*, 2002b). De bacteriën (4×10^8 in 1 ml LB medium) worden overgebracht naar een glazen ampoule die afgesloten wordt. Een ampoule die enkel medium bevat, doet dienst als controle. De ampoules worden vervolgens in de meetcellen gebracht die zich in een zeer nauwkeurig gereguleerd waterbad ($37 \pm 2 \times 10^{-4}$ °C) bevinden waar de warmtefluxen geregistreerd worden. Stabiele signalen worden gewoonlijk bekomen na een equilibratieperiode van 1 à 2h.

6.6 Statistische methoden

6.6.1 Analyse van overlevingsdata

Voor het opstellen van de correcte overlevingscurven wordt gebruik gemaakt van de Kaplan-Meier methode in het SPSS pakket (SPSS 14.0.2, SPSS Inc., Chicago, USA). De sterkte van deze methode is dat ze rekening houdt met gecensorde gegevens (Kaplan en Meier, 1958; Altman en Bland, 1998). Dit wil zeggen dat wormen die op een bepaalde dag van de Petriplaat kruipen en sterven door uitdroging op de wand niet zomaar uit het experiment geschrapt worden. Zij worden echter ook niet beschouwd als dood tengevolge van veroudering, maar worden meegeteld als 'in leven' tot de dag waarop ze van de plaat verdwijnen. Daarna worden ze uitgesloten. Deze wormen worden de gecensorde waarnemingen genoemd. De proportie (%) overlevers wordt vervolgens bepaald, rekening houdend met deze gecensorde gegevens. Het effect van het opnemen van de gecensorde waarnemingen in de overlevingscurve op de vorm van de curve is gewoonlijk slechts beperkt (Fig. 6.2).



Figuur 6.2: Weergave van een overlevingscurve, al dan niet rekening houdend met de gecensorde waarnemingen.

De niet-parametrische log-rank test wordt gebruikt voor de onderlinge vergelijking van overlevingscurven. Het voordeel van deze test is dat er geen informatie vereist is over de vorm van de overlevingscurve (Bland en Altman, 2004). Er moet wel aan de voorwaarde van de zogenaamde proportionele *hazard* ratio's voldaan zijn. Dit betekent dat indien op een bepaald tijdstip het risico op sterven voor de ene populatie tweemaal hoger zou zijn dan voor de andere populatie, deze ratio behouden moet blijven op eender welk ander tijdstip. Met andere woorden, de *hazard* ratio's moeten constant blijven in de tijd. In de praktijk blijkt dat gewoonlijk aan de assumptie voldaan is indien de vorm van de te vergelijken overlevingscurven niet te sterk verschilt. Kleine afwijkingen zijn echter toegestaan (Bewick *et al.*, 2004). Of aan de voorwaarde voor proportionele *hazard* ratio's voldaan werd, werd niet systematisch getest. Er werd wel een steekproef uitgevoerd bij een aantal experimenten (zie figuur 7.4 en 7.20) en in deze gevallen werd steeds aan de assumptie voldaan. De log-rank test zal voornamelijk significante verschillen tussen twee

overlevingscurven detecteren indien de sterftegraad in de ene populatie systematisch hoger ligt dan in de andere populatie. In tegenstelling tot sommige andere rank testen, hebben alle doden in de log-rank test hetzelfde gewicht (Mathew *et al.*, 1999).

6.6.2 Analyse van de wormvolumes

De bepaling van de wormvolumes in functie van een scala aan voedselconcentraties werd in meervoud uitgevoerd. Niet alle voedselconcentraties konden echter steeds in elk experiment opgenomen worden (zie tabel 6.2 voor een voorbeeld). Indien de gemiddelde uitkomst tussen de replica's verschillend is, kan deze proefopzet echter leiden tot een vertekend verschil in volume. Verschillen in wormvolume zouden in dit geval kunnen veroorzaakt worden door verschillen tussen replica's eerder dan door verschillen in voedselconcentratie. Bij de analyse van deze datasets moet bijgevolg rekening gehouden worden met het feit dat de fout op de gemiddelde waarden van de volumes door twee factoren bepaald wordt. Enerzijds is er de variatie tussen de verschillende replica's en anderzijds is er de residuele ruis rond de voorspelde respons die inherent is aan een meting. Daarom werd er gebruik gemaakt van een algemeen gemengd lineair model (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, USA). Dit biedt de mogelijkheid om enerzijds de *fixed effects* te modelleren (zijnde de effecten van de voedselconcentratie op het volume) en anderzijds de foutstructuur door middel van *random effects* te modelleren. Omdat dit model een globale output oplevert, die enkel iets zegt over het al dan niet voorkomen van significante verschillen over alle gegevens heen (m.a.w. is er al dan niet een effect van de voedselconcentratie op het volume van de wormen), wordt er nog een *post-hoc* test uitgevoerd die moet toelaten de significante verschillen te situeren. In dit geval is dat de Tukey test, waarin alle gemiddelden twee aan twee met elkaar vergeleken worden. De analyses werden steeds uitgevoerd op de ruwe data.

Replica	Voedselconcentratie (# bact/pl)				
	2×10^6	2×10^7	2×10^8	2×10^9	2×10^{10}
1	x	x	x	x	x
2			x	x	x
3	x	x	x	x	x
4	x	x			

Tabel 6.2: Voorbeeld van een dataset voor volumebepaling. Een 'x' geeft aan dat de voedselconcentratie opgenomen werd in de replica.

6.6.3 Analyse van het aantal nakomelingen

Ook bij de experimenten waarin het aantal nakomelingen bepaald werd, werden niet steeds alle voedselconcentraties in elk experiment opgenomen. Omdat de foutstructuur van een telling echter niet normaal, maar wel Poisson verdeeld is, werd er gebruik gemaakt van een veralgemeend gemengd lineair model (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, USA), waarbij gecorrigeerd werd voor overdispersie. Indien slecht één enkel tellingsexperiment uitgevoerd

werd, werd gebruik gemaakt van een veralgemeend lineair model met Poisson verdeling. De analyses werden steeds uitgevoerd op de ruwe data.

6.6.4 Analyse van metabole parameters en enzymatische testen

De bepaling van de ATP-concentratie, lichtproductiepotentiaal, autofluorescentie en de activiteit van het enzym aconitase werd uitgevoerd op drie onafhankelijke verouderende reeksen. Zowel het effect van de leeftijd als van een mutatie op deze parameters werd onderzocht. Omdat de metingen per replica uitgevoerd werden op subfracties van een wormpopulatie (en de stalen binnen één replica bijgevolg niet onafhankelijk zijn van elkaar) werd hier gebruik gemaakt van een *repeated measures* ANOVA (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, USA). Enkel voor de statistische analyse van de lichtproductiepotentiaal werden de gegevens getransformeerd (ln). In alle andere gevallen werd gewerkt met de ruwe data. Aangezien het werken met meerdere replica's het moeilijk maakt om formeel te testen of aan de voorwaarden voor een normaalverdeling voldaan is, werd dit visueel nagegaan.

7 Resultaten en discussie

7.1 Optimalisatie van nieuwe methoden voor CR in *C. elegans*

Ingediend voor publicatie als:

Lenaerts, I., Walker, G., Van Hoorebeke, L., Gems, D., Vanfleteren, J. (2007). Dietary restriction of *Caenorhabditis elegans* by axenic culture reflects nutritional requirement for constituents provided by metabolically active microbes. *Journals of Gerontology: Biological Sciences*

Persoonlijke bijdrage aan dit hoofdstuk:

- Optimalisatie van nieuwe methoden voor CR in *C. elegans*:
 - Verdunning van *E. coli* in afwezigheid van extra nutriënten
 - Verdunning van bestraalde *E. coli* op axenische platen
- Effect van dipeptidemix op ontwikkeling van *C. elegans* in axenisch medium
- Effect van leverextract op CR effecten van axenisch medium
- Karakterisering van bestraalde bacteriën
- Effect van bacteriële stralingsdosis op levensduur en fertiliteit van *C. elegans*

7.1.1 Inleiding

Hoewel de levensduurverlengende effecten van CR reeds meer dan 70 jaar gekend zijn (McCay *et al.*, 1935), werden verrassend genoeg slechts weinig experimenten uitgevoerd in *C. elegans*. Dit organisme is nochtans erg in trek als modelsysteem voor het onderzoek naar veroudering. De voornaamste reden hiervoor is het gebrek aan betrouwbare en vooral reproduceerbare methoden om CR toe te passen. De verschillende manieren die gebruikt worden om wormen te onderwerpen aan CR kunnen in drie groepen onderverdeeld worden: (1) verdunning van de bacteriële voedselbron in buffer (Klass, 1977) of op agarplaten (Hosono *et al.*, 1989), (2) gebruik van *eat* mutanten die zich niet normaal kunnen voeden (Lakowski en Hekimi, 1998) en (3) groei in axenisch medium in afwezigheid van *E. coli* (Vanfleteren en Braeckman, 1999). Hoewel deze interventies gelijkaardige effecten hebben op stressresistentie en metabolisme, blijken ze toch niet identiek te zijn (Houthoofd *et al.*, 2002a, Houthoofd *et al.*, 2002b). Bijgevolg veroorzaakt het gebruik van al deze verschillende methoden moeilijkheden bij het ontrafelen van de betrokken mechanismen.

Tot hiertoe werden de meeste verouderingsstudies uitgevoerd onder standaard kweekcondities, waarbij wormen gegroeid worden op NGM platen met een laagje OP50. Deze methode is uitgegroeid tot dé referentiemethode voor het kweken van *C. elegans*. Vermoedelijk daarom heeft de studie van CR in vloeibare cultuur in aanwezigheid van dalende concentraties aan bacteriën, zoals voorgesteld door Klass (1977), niet veel navolging gekregen. Verder kan het opgroeien van wormen in vloeibaar medium met lage

hoeveelheden aan bacteriën tot technische problemen leiden, aangezien het niet eenvoudig is om deze lage bacteriële concentraties accuraat te behouden en te reproduceren. De plaatmethode van Hosono en collega's (1989), waarbij de concentratie aan bactopecton in de voedingsbodems gevarieerd wordt, ziet er daarom veelbelovender uit. De verlengde levensduur gaat hier echter niet gepaard met een tragere ontwikkeling, en vreemd genoeg lijkt de fertiliteit positief beïnvloed te worden. Er werd namelijk een 1.5-voudige toename van het aantal nakomelingen geobserveerd op bactopectone-vrije platen. De 160 nakomelingen op de controleplaten met hoge bactopecton concentratie vormen bovendien een laag aantal in vergelijking met de eerder gepubliceerde 273 nakomelingen van Klass (1977). Dit suggereert dat de positieve effecten van een dalende *E. coli* concentratie eerder een gevolg zijn van het opheffen van een toxisch effect geassocieerd met een hoge concentratie aan bacteriën, dan van CR. De moeilijkheid met het gebruik van *eat* mutanten is dat de verlengde levensduur van deze mutanten erg conditie-afhankelijk is en dat ze niet in alle laboratoria langlevend zijn (zie ook 7.2). Hoewel groei in axenisch medium de enige echt reproduceerbare methode is die een grote toename in de gemiddelde en maximale levensduur veroorzaakt, is het gebruik ervan beperkt omdat het niet op een kwantitatieve manier kan toegepast worden. Bijgevolg ontbreken ook goed gevoede condities. Tenslotte is axenisch medium een rijk kweekmedium, waardoor het onduidelijk is waarom wormen in deze omstandigheden gerestricteerd zijn.

Er kan geconcludeerd worden dat de bestaande methoden om *C. elegans* te onderwerpen aan calorische restrictie niet voldoende robuust en reproduceerbaar zijn om principes over deze interventie aan te tonen. Daarom zou de ontwikkeling van een eenvoudige en reproduceerbare methode van onschatbare waarde zijn voor onderzoek naar calorische restrictie in dit organisme. Het doel van deze studie was dan ook de optimalisatie van nieuwe methoden voor CR in *C. elegans*. Drie nieuwe methoden op basis van vaste voedingsbodems worden uitvoerig beschreven. Twee van deze methoden maken gebruik van axenisch medium. Omdat het onduidelijk is waarom axenisch gekweekte wormen gerestricteerd en bijgevolg langlevend zouden zijn, werd ook een poging ondernomen om hierop een antwoord te vinden.

7.1.2 Materiaal en methoden

In deze studie werden wormen zowel op agarplaten als in vloeibare cultuur gekweekt. Bij de experimenten op vaste voedingsbodems werd steeds gebruik gemaakt van de wild type stam N2. In vloeibare cultuur werd soms gewerkt met mutante i.p.v. wild type wormen, omdat dit de behandeling van de wormen in vloeibaar milieu vergemakkelijkt. De temperatuursensitieve steriele mutanten *glp-4* en *glp-4;daf-16* werden gebruikt. De *glp-4* mutatie verhindert de productie van nakomelingen, maar interfereert met de DAF-2/insuline *pathway*, waardoor de wormen iets langer leven dan normaal. De bijkomende mutatie in *daf-16* corrigeert hiervoor en bijgevolg hebben de dubbelmutanten een wild type levensduur. Indien een experiment uitgevoerd werd met een *C. elegans* mutant wordt dit steeds uitdrukkelijk vermeld. Bij de overlevingsexperimenten werd steeds 50 μ M FudR toegevoegd op het moment dat de wormen het adulte stadium naderden (ook aan de

temperatuursensitieve mutanten werd FudR toegevoegd). De dag waarop FudR werd toegevoegd, wordt gedefinieerd als dag 0. Voor de overlevingsexperimenten en de bepaling van de fertiliteit werd gewerkt met Petriplaatjes met een diameter van 5.5 cm. Omdat voor de bepaling van de volumes echter grotere hoeveelheden wormen nodig zijn, werd daar gebruik gemaakt van grotere platen (Ø 8.5 cm). Om de dikte van de laag bacteriën op de grote en kleine Petriplaten gelijk te houden, werd op de platen voor de volumebepalingen een hogere concentratie aan bacteriën gebracht, rekening houdend met de oppervlakte van de plaat. Voor elk experiment wordt aangegeven welke bacteriestam gebruikt werd (K12 of OP50). Tenzij anders aangegeven, werden bestraalde bacteriën behandeld met een stralingsdosis van 10 kGy. Niet-bestraalde bacteriën werden voor gebruik steeds gewassen met S-buffer om de resten kweekmedium te verwijderen. Dipeptiden werden aangekocht bij Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Bacteriële filtraten werden bereid door een *E. coli* suspensie gedurende 6 maal 10 s te soniceren op ijs, met telkens 20 s rust tussen de sonicatieronden. De bacteriën werden gesoniceerd in 1 ml volumes aan een concentratie van 3×10^{10} cellen/ml. Vervolgens werden de sonicaten gesteriliseerd door filtratie door een 0.22 µm membraanfilter. Plantenextracten werden gemaakt met behulp van een mixer, waarna ze gefiltreerd werden door een 0.22 µm membraanfilter. Leverextract werd gemaakt op basis van verse paardelever, gefiltreerd doorheen Seitz filters en bewaard bij -30°C tot gebruik. De experimenten werden uitgevoerd bij 20, 22.5 of 24°C. In de legende van de figuren wordt telkens aangeduid wat de temperatuur van het betreffende experiment was.

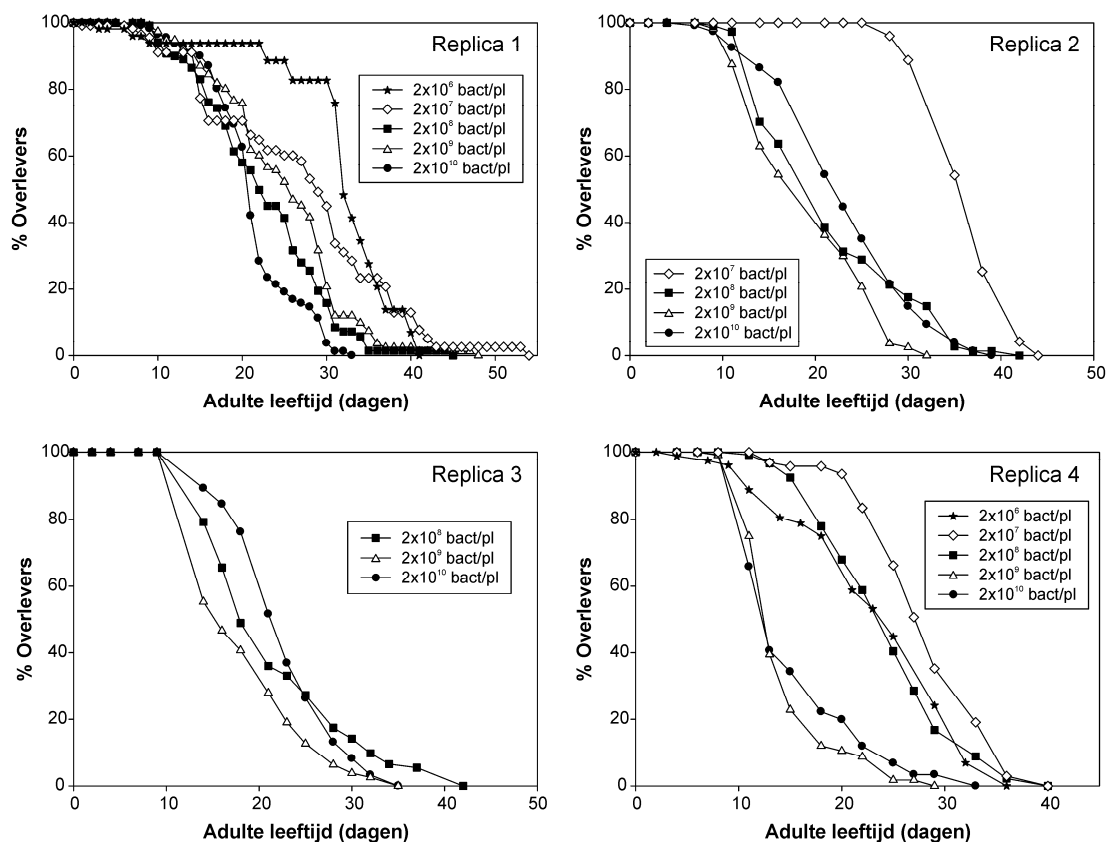
7.1.3 Resultaten

7.1.3.1 Nieuwe methoden voor CR op vaste voedingsbodems

*7.1.3.1.1 Verdunning van *E. coli* in afwezigheid van extra nutriënten*

In een eerste benadering werd gebruik gemaakt van agarplaten zonder nutriënten (agar n°1) met daarop gewassen *E. coli* (K12). Door de afwezigheid van voedingsstoffen in deze platen kunnen de cellen niet meer delen, waardoor de dikte van de laag bacteriën kan gevarieerd worden. Deze methode is vergelijkbaar met de verdunningsmethode van Klass (1977), met als enige verschil dat hier gewerkt wordt met agarplaten in plaats van met buffer. Bijgevolg wordt tegemoet gekomen aan de voorkeur van de meeste *C. elegans* laboratoria om met vaste voedingsbodems te werken. L1 larven werden op deze agar n°1 platen gebracht in aanwezigheid van verschillende concentraties aan gewassen bacteriën, variërend van 2×10^{10} bact/pl tot 2×10^6 bact/pl. De concentratie aan bacteriën op de platen had slechts een beperkte invloed op de ontwikkelingstijd van de wormen. De meeste wormen werden adult op twee dagen. Enkel op 2×10^6 bact/pl werden pas na drie dagen adulten geobserveerd. Als de wormen het adulte stadium naderden werden ze overgebracht naar platen met FudR. In figuur 7.1 en tabel 7.1 worden de resultaten van vier overlevingsexperimenten weergegeven.

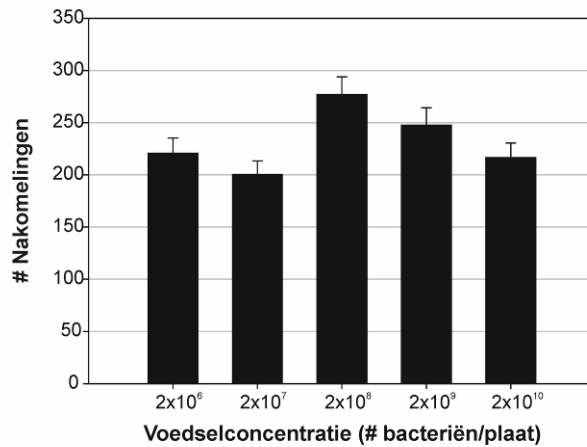
Er werd een verlengde levensduur waargenomen indien de concentratie aan bacteriën verminderd werd van 2×10^{10} tot 2×10^7 of 2×10^6 bact/pl. De omvang van de levensduurverlenging varieert echter van 20% tot bijna 100% afhankelijk van de replica. Ook op de hogere concentraties aan bacteriën werd nogal wat variatie geobserveerd. Wormen op 2×10^9 en 2×10^8 bact/pl leefden afhankelijk van de replica korter of langer dan wormen op 2×10^{10} bact/pl. Hoewel de verschillen in sommige gevallen significant zijn, is dit waarschijnlijk niet biologisch relevant, aangezien de wormen gemiddeld gezien wel steeds een wild type levensduur hebben.



Figuur 7.1: Overleving van *C. elegans* op agar n°1 platen met verschillende concentraties gewassen bacteriën (*E. coli* K12). De experimenten werden uitgevoerd bij 20°C.

Naast eventuele effecten op de levensduur werd ook nagegaan of de verdunning van de bacteriële voedingsbron op agar n°1 platen een invloed heeft op de fertiliteit. Het gemiddeld aantal nakomelingen verspreid over 7 gedeeltelijk overlappende experimenten werd bepaald. Er was een relatief klein replica-effect op het aantal nakomelingen (variantie tussen replica's = 0.022 ± 0.01). Per concentratie werd een totaal van ongeveer 60 à 80 adulten opgevolgd. Tegen de verwachtingen in blijkt dat het verminderen van de concentratie aan bacteriën op platen zonder nutriënten geen eenduidig effect heeft op de fertiliteit (Fig. 7.2). Een maximaal aantal nakomelingen van 277 werd geobserveerd bij een concentratie van 2×10^8 bact/pl. Hoewel het aantal nakomelingen op 2×10^7 en 2×10^6 bact/pl significant lager was dan op 2×10^8 bact/pl, bedraagt het verschil nauwelijks 20 à 30%. Zo werden op 2×10^7 bact/pl 200 ($p < 0.0001$) en op 2×10^6 bact/pl 221 ($p < 0.0001$) nakomelingen

geteld. Hoewel het aantal nakomelingen op 2×10^9 bact/pl iets lager was (248) dan op 2×10^8 bact/pl, was dit verschil niet significant ($p = 0.16$). Op 2×10^{10} bact/pl werden ongeveer 217 nakomelingen geteld ($p < 0.0001$ t.o.v. 2×10^8 bact/pl en $p = 0.1405$ t.o.v. 2×10^9 bact/pl).

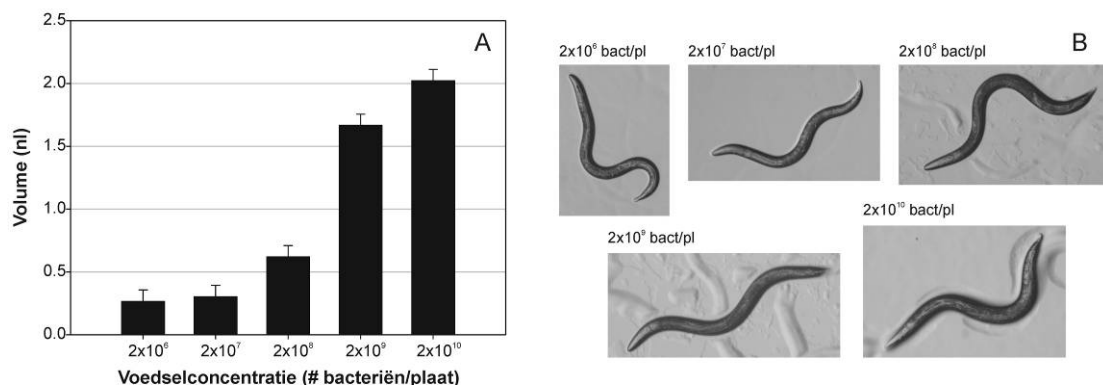


Figuur 7.2: Fertiliteit van *C. elegans* in functie van de voedselconcentratie. Agar n°1 platen met verschillende concentraties gewassen *E. coli* cellen (20°C). De fouten-vlaggen geven de standaardfout weer.

Bacteriële concentratie	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	<i>N</i>	<i>p</i> (log-rank)
<i>Replica 1</i>					
2×10^{10} bact/pl	21.3 ± 0.5	23 ± 0.7	-	99	-
2×10^9 bact/pl	24.7 ± 0.8	30 ± 0.5	+ 16	99	< 0.0001
2×10^8 bact/pl	22.7 ± 0.7	29 ± 1.1	+ 6.6	92	0.028
2×10^7 bact/pl	27.2 ± 1.3	34 ± 2.0	+ 27.7	59	< 0.0001
2×10^6 bact/pl	31.7 ± 1.5	36 ± 1.5	+ 48.8	17	< 0.0001
<i>Replica 2</i>					
2×10^{10} bact/pl	23.7 ± 0.7	28 ± 1.1	-	83	-
2×10^9 bact/pl	19.6 ± 0.6	25 ± 0.9	-17.3	97	< 0.0001
2×10^8 bact/pl	22.1 ± 0.8	28 ± 2.3	- 6.8	87	0.358
2×10^7 bact/pl	28.4 ± 0.7	33 ± 1.2	+ 19.8	73	< 0.0001
<i>Replica 3</i>					
2×10^{10} bact/pl	22.9 ± 0.6	28 ± 0.8	-	78	-
2×10^9 bact/pl	18.9 ± 0.6	23 ± 1.0	- 17.5	91	< 0.0001
2×10^8 bact/pl	21.9 ± 0.8	28 ± 1.2	- 4.4	103	0.531
<i>Replica 4</i>					
2×10^{10} bact/pl	15.7 ± 0.6	18 ± 1.4	-	107	-
2×10^9 bact/pl	14.7 ± 0.4	15 ± 0.8	- 6.4	94	0.319
2×10^8 bact/pl	24.8 ± 0.6	29 ± 0.6	+ 58	107	< 0.0001
2×10^7 bact/pl	30.4 ± 0.6	35 ± 0.8	+ 93.6	112	< 0.0001
2×10^6 bact/pl	30.9 ± 0.9	35 ± 0.6	+ 96.8	33	< 0.0001

Tabel 7.1: Overzicht van de overlevingsgegevens op agar n°1 platen met verschillende concentraties gewassen bacteriën. Deze resultaten stellen vier onafhankelijke experimenten voor. De gemiddelde adulte levensduur is uitgedrukt in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur t.o.v. 2×10^{10} bact/pl. Deze experimenten werden uitgevoerd bij 20°C.

In figuur 7.3A worden de wormvolumes in functie van de voedselconcentratie weergegeven. De resultaten stellen het gemiddelde van vier gedeeltelijk overlappende experimenten voor. Hoewel een zeer klein replica-effect op het volume werd vastgesteld (variantie tussen replica's = 0.0065 ± 0.01), was dit niet significant. Een maximaal volume van 2 nl werd bereikt bij 2×10^{10} bact/pl. Naarmate de voedselconcentratie op de platen verminderde, werd een daling van het volume waargenomen tot 0.27 nl bij 2×10^6 bact/pl. Dit blijkt ook uit de foto's in figuur 7.3B. Bemerkt dat de volumes bepaald werden door een 'bulk' meting van de lengte en de breedte van een groot aantal wormen in een staal, terwijl de foto's uiteraard individueel zijn. De grotere mate van populatieheterogeniteit bij de laagste voedselconcentraties heeft vermoedelijk tot gevolg dat een aantal contaminerende juvenielen mee gemeten wordt, met een potentiële onderschatting van de volumes tot gevolg.



Figuur 7.3: (A) Wormvolumes in functie van de voedselconcentratie. Agar n°1 platen met verschillende concentraties gewassen *E. coli* K12 cellen (20°C). De foutenvlaggen geven de standaardfout weer. (B) Foto's van twee-dagen-oude adulte wormen op agar n°1 platen met verschillende concentraties gewassen bacteriën (20°C). Gebruikte vergroting: 75.5x.

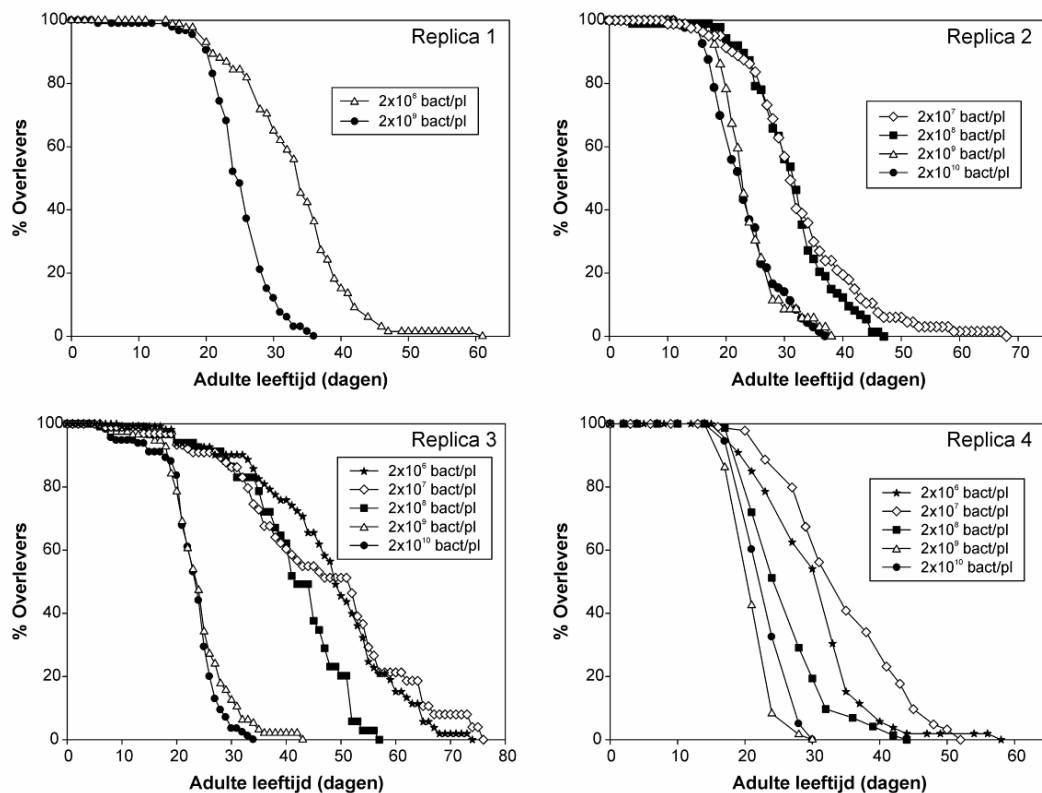
In tabel 7.2 wordt het effect van de voedselconcentratie op de lengte en de breedte van de wormen afzonderlijk weergegeven. Uit de gegevens blijkt dat het beperken van de hoeveelheid voedsel gepaard gaat met een reductie van zowel de lengte als de breedte van de wormen.

Bacteriële concentratie	Lengte (μm) \pm SE	% Lengte	Breedte (μm) \pm SE	% Breedte
2×10^{10} bact/pl	1121.42 ± 47.1	100	47.4 ± 1.8	100
2×10^9 bact/pl	1051.5 ± 47.1	93.8	44.3 ± 1.8	92.8
2×10^8 bact/pl	773 ± 47.1	68.9	31.5 ± 1.8	65.8
2×10^7 bact/pl	573.8 ± 46.8	51.2	25 ± 1.8	52.7
2×10^6 bact/pl	553 ± 46.8	49.3	23.6 ± 1.8	49.8

Tabel 7.2: Effect van een dalende bacteriële concentratie op de lengte en de breedte van wormen. Agar n°1 platen met gewassen bacteriën. De wormen werden gegroeid bij 20°C.

7.1.3.1.2 Verdunning van *E. coli* op axenische platen

In een tweede benadering werd gebruik gemaakt van axenisch medium in agarplaten. Initiële testen toonden aan dat *C. elegans* op deze platen zeer asynchroon ontwikkelde en bovendien bereikten veel wormen nooit het adulte stadium. Daarom werden de nematoden voorzien van levende *E. coli* cellen. Omdat axenisch medium rijk is aan nutriënten, kunnen bacteriën echter ongebreideld groeien op dergelijke voedingsbodems en dus werd gebruik gemaakt van bacteriën die niet meer kunnen delen. In eerste instantie werden *E. coli* cellen (stam K12) daartoe bestraald met elektronen. Een dosis van 10 kGy verhindert stevast de groei van een bacteriële cultuur. De concentratie aan bestraalde bacteriën werd ook hier gevarieerd van 2×10^{10} tot 2×10^6 bact/pl. Indien wormen gegroeid werden op 2×10^{10} , 2×10^9 of 2×10^8 bact/pl werd een wild type ontwikkelingstijd van twee dagen vastgesteld. Wormen die gekweekt werden op 2×10^7 bact/pl deden er drie dagen over om te ontwikkelen tot adulten en deze periode verlengde tot 10 à 11 dagen indien slechts 2×10^6 bacteriën op de platen gebracht werden. Dit suggereert dat, in vergelijking met de levende bacteriën die gebruikt werden bij de hoger beschreven methode, de voedingswaarde van bestraalde bacteriën wat verminderd is. Alternatief zou het axenisch medium kunnen interfereren met de normale opname van nutriënten. Ook de invloed van de voedselconcentratie op de levensduur werd onderzocht. De resultaten van vier onafhankelijke experimenten zijn weergegeven in figuur 7.4 en tabel 7.3.



Figuur 7.4: Overleving van *C. elegans* op agarplaten met axenisch medium met verschillende concentraties bestraalde bacteriën (*E. coli* K12, 10 kGy). De experimenten werden uitgevoerd bij 20°C.

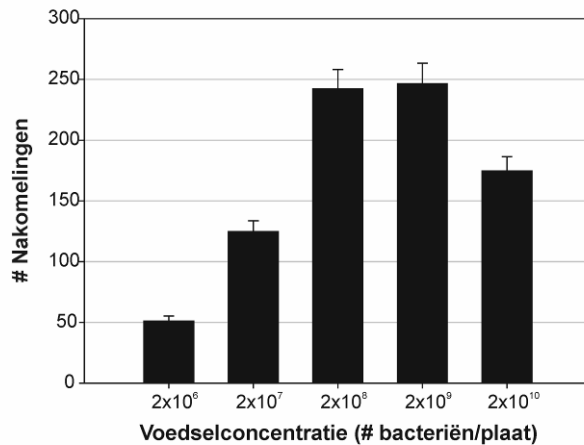
Indien de concentratie aan bacteriën op de axenische platen verminderd werd van 2×10^{10} tot 2×10^9 bact/pl, werd geen significante verlenging van de levensduur waargenomen. Als de concentratie aan bacteriën verder verlaagd werd tot 2×10^8 bact/pl, leefden de wormen 12 tot 80% langer. Een verdere reductie van de dikte van de bacteriële laag veroorzaakte nog een bijkomende verlenging van de levensduur, met een maximale verlenging met ongeveer 110% bij 2×10^6 bact/pl. Enkel bij de vierde replica werd een kleine verkorting van de levensduur waargenomen van wormen die gegroeid werden op 2×10^6 bact/pl in vergelijking met wormen die gekweekt werden op 2×10^7 bact/pl.

Bacteriële concentratie	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	N	p (log-rank)
<i>Replica 1</i>					
2×10^9 bact/pl	25.3 ± 0.5	28 ± 0.6	-	78	-
2×10^8 bact/pl	33.4 ± 0.9	38 ± 0.9	+ 32	71	< 0.0001
<i>Replica 2</i>					
2×10^{10} bact/pl	23.4 ± 0.6	26 ± 0.8	-	77	-
2×10^9 bact/pl	24.3 ± 0.8	28 ± 0.7	+ 3.8	48	0.390
2×10^8 bact/pl	31.7 ± 0.8	36 ± 1.2	+ 35.5	81	< 0.0001
2×10^7 bact/pl	32.9 ± 1.2	37 ± 1.9	+ 40.6	70	< 0.0001
<i>Replica 3</i>					
2×10^{10} bact/pl	23.1 ± 0.5	26 ± 0.4	-	90	-
2×10^9 bact/pl	24.1 ± 0.5	27 ± 0.8	+ 4.3	101	0.152
2×10^8 bact/pl	41.4 ± 1.3	48 ± 1.4	+ 79.2	43	< 0.0001
2×10^7 bact/pl	47.1 ± 2	57 ± 2.8	+ 103.9	50	< 0.0001
2×10^6 bact/pl	48.2 ± 1.5	56 ± 2.1	+ 108.7	59	< 0.0001
<i>Replica 4</i>					
2×10^{10} bact/pl	24.0 ± 0.4	28 ± 0.4	-	83	-
2×10^9 bact/pl	22.1 ± 0.3	24 ± 0.3	- 7.9	84	< 0.0001
2×10^8 bact/pl	26.9 ± 0.7	30 ± 0.9	+ 12	73	< 0.0001
2×10^7 bact/pl	35.1 ± 0.9	41 ± 1.5	+ 46.3	76	< 0.0001
2×10^6 bact/pl	30.9 ± 0.9	35 ± 0.6	+ 28.8	60	< 0.0001

Tabel 7.3: Overzicht van de overlevingsgegevens op axenische platen met verschillende concentraties bestraalde bacteriën. Deze resultaten stellen vier onafhankelijke experimenten voor. De gemiddelde adulte levensduur is uitgedrukt in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur tov 2×10^{10} bact/pl. Deze experimenten werden uitgevoerd bij 20°C.

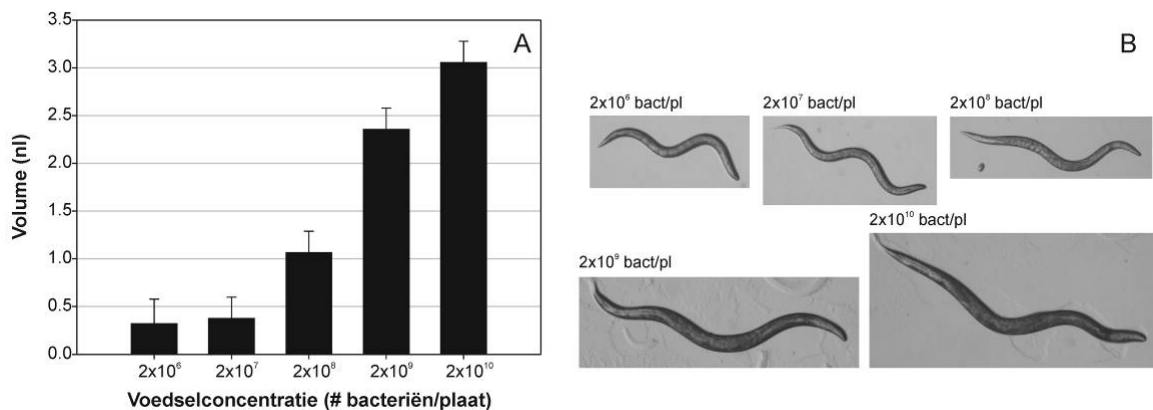
In figuur 7.5 wordt de invloed van de voedselconcentratie op de fertiliteit weergegeven. Deze figuur geeft het gemiddelde aantal nakomelingen verspreid over 8 gedeeltelijk overlappende experimenten. Er was een klein effect van de replica op het aantal nakomelingen (variantie tussen replica's = 0.028 ± 0.02). Per concentratie werd een totaal van ongeveer 50 à 90 adulten opgevolgd. Uit de figuur is af te leiden dat het aantal geproduceerde nakomelingen maximaal is bij een bacteriële concentratie tussen 2×10^8 en 2×10^9 bact/pl en ongeveer 245 bedraagt. Lagere hoeveelheden aan bacteriën op de platen veroorzaakten een aanzienlijke reductie van de fertiliteit. Op 2×10^7 bact/pl werden nog 125

nakomelingen geteld ($p < 0.0001$ t.o.v. 2×10^8 bact/pl). Op 2×10^6 bact/pl waren het er nog slechts 51 ($p < 0.0001$ t.o.v. 2×10^7 bact/pl en 2×10^8 bact/pl). Dit is dus een reductie van het aantal nakomelingen met 50 à 80%. Ook een dikkere laag bacteriën veroorzaakte een verminderde fertiliteit. Zo werden op 2×10^{10} bact/pl slechts 175 nakomelingen geteld ($p < 0.0001$ t.o.v. 2×10^9 bact/pl). Deze daling is mogelijk een gevolg van toxische componenten die afgegeven worden door het grote aantal bacteriën. Het gaat hier echter niet om een infectie, aangezien de bestraalde cellen replicatief dood zijn.



Figuur 7.5: Fertiliteit van *C. elegans* in functie van de voedselconcentratie. Axenische platen met verschillende concentraties bestraalde *E. coli* K12 cellen (10 kGy, 20°C). De foutenvlaggen geven de standaardfout weer.

Figuur 7.6A geeft het volume van de wormen weer in functie van de voedselconcentratie. De resultaten stellen het gemiddelde van vier gedeeltelijk overlappende replica's voor. Er was geen replica-effect op het volume (variantie tussen replica's = 0). Een maximaal volume van 3.1 nl wordt bereikt op de hoogste voedselconcentratie. Naarmate de dikte van de laag bacteriën op de platen afneemt, wordt een graduele daling van het volume waargenomen.



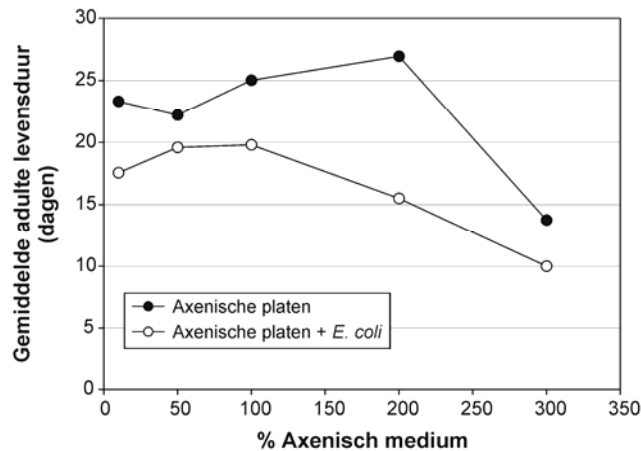
Figuur 7.6: (A) Wormvolumes in functie van de voedselconcentratie. Axenische platen met verschillende concentraties bestraalde *E. coli* K12 cellen (10 kGy, 20°C). De foutenvlaggen geven de standaardfout weer. (B) Foto's van twee-dagen-oude adulte wormen op agarplaten met axenisch medium met verschillende concentraties bestraalde bacteriën (10 kGy, 20°C). Gebruikte vergroting: 75.5x.

Een synchrone wormpopulatie bekomen op een laag bacteriën van slechts 2×10^6 of 2×10^7 cellen is niet mogelijk en dus kunnen ook hier niet-ontwikkende juvenielen (en de 'bulk' meting van de lengtes en de breedtes) een onderschatting van de volumes op de laagste concentraties aan bacteriën veroorzaken. In figuur 7.6B worden een aantal foto's getoond van wormen op verschillende concentraties aan bestraalde bacteriën. De wormen op de foto's zijn allemaal adult (vulva's open). In tabel 7.4 worden de lengtes en breedtes nog eens afzonderlijk weergegeven. Hieruit blijkt dat zowel de lengte als de breedte van de wormen daalt in functie van een dalende voedselconcentratie, en dit in gelijke mate.

Bacteriële concentratie	Lengte (μm) \pm SE	% Lengte	Breedte (μm) \pm SE	% Breedte
2×10^{10} bact/pl	1287.1 ± 57.5	100	54.6 ± 2.1	100
2×10^9 bact/pl	1203.8 ± 57.5	93.5	49.7 ± 2.1	91
2×10^8 bact/pl	916.3 ± 57.5	71.2	38.1 ± 2.1	69.8
2×10^7 bact/pl	663.40 ± 57.5	51.5	25.8 ± 2.1	47.3
2×10^6 bact/pl	642.8 ± 66.4	49.9	24.4 ± 2.4	44.7

Tabel 7.4: Effect van een dalende bacteriële concentratie op de lengte en de breedte van wormen. Axenisch medium in agarplaten met bestraalde bacteriën. De wormen werden gegroeid bij 20°C.

Omdat slechts weinig laboratoria toegang hebben tot een elektronenversneller, werd een alternatief protocol ontwikkeld voor het toepassen van CR op axenische platen (G. Walker en D. Gems, UCL, Londen). Wormen werden tot de eerste dag van het adulte stadium opgegroeid op axenisch medium in agarplaten met 7.5×10^8 carbenicilline-behandelde *E. coli* (OP50). De resulterende populaties ontwikkelden synchroon en hadden een volume dat gelijkaardig is aan dat van standaard gekweekte wormen (op NGM platen met levende *E. coli*, niet getoond). Na de eerste dag van het adulte stadium werden de wormen getransfereerd naar axenische platen met 7.5×10^8 carbenicilline-behandelde bact/pl (de diameter van de platen bedroeg 6 cm) (goed gevoede conditie) of naar axenische platen zonder *E. coli* (CR conditie). In beide condities werd ook 1 mM carbenicilline toegevoegd aan de platen. Wormen die gegroeid werden onder CR condities vertoonden een verlengde levensduur die typisch wordt waargenomen bij axenisch gekweekte nematoden (Fig. 7.7). Het toevoegen van *E. coli* aan de axenische platen onderdrukte volledig deze levensduurverlenging. De levensduur van wormen op de axenische platen werd rechtstreeks vergeleken met deze van wormen op NGM platen (met carbenicilline in beide condities), maar er werd geen significant verschil waargenomen (Fig. 7.7). De vergelijking van populaties op axenische platen met en zonder carbenicilline toont aan dat dit antibioticum geen nadelige invloed heeft op de levensduur van *C. elegans* bij de gebruikte concentratie (Fig. 7.7).



Figuur 7.7: Overleving van *C. elegans* op NGM platen en agarplaten met axenisch medium in aan- of afwezigheid van carbenicilline-behandelde *E. coli* OP50. Het experiment werd uitgevoerd bij 22.5°C. Aan alle platen werd carbenicilline toegevoegd.

7.1.3.2 Mechanismen van levensduurverlenging in axenische cultuur

De kweek van *C. elegans* in axenische cultuur resulteert in kleine wormen met een vertraagde ontwikkeling, gereduceerde fertiliteit en verlengde levensduur. Bovenstaande resultaten beschrijven methoden voor CR op axenisch medium in agarplaten. Door het toevoegen van bestraalde of carbenicilline-behandelde bacteriën worden de effecten van het medium op ontwikkeling, lichaamsgrootte, fertiliteit en levensduur onderdrukt. Dit impliceert dat *E. coli* een specifieke component bevat die afwezig is in axenisch medium en die noodzakelijk is voor de voeding van *C. elegans*.

7.1.3.2.1 De concentratie aan nutriënten in axenisch medium is niet bepalend voor het CR effect

Bovenstaande resultaten suggereren dat axenisch medium deficiënt is in kritieke nutritionele componenten die aanwezig zijn in *E. coli*. Om te onderzoeken om welke componenten het gaat, werd de samenstelling van axenisch medium vergeleken met deze van een *E. coli* (OP50) suspensie (in water) met een concentratie die voldoende is om de effecten van axenische cultuur te onderdrukken (3.8×10^7 bact/ml). Deze analyse werd uitgevoerd door een commerciële firma (Leatherhead Food International, Wells, UK, in opdracht van G. Walker en D. Gems). Eerst werd de calorische waarde van de twee cultuurmedia vergeleken. Terwijl de energetische waarde van 100 ml axenisch medium ongeveer 20 kcal bedroeg, lag deze van een gelijk volume *E. coli* onder de detectielimiet (lager dan 3 kcal). Dus, axenisch medium is niet in staat om een normale groei van *C. elegans* te ondersteunen, ondanks het feit dat de calorische waarde van dit medium ongeveer zes maal hoger ligt dan dat van een *E. coli* concentratie die voldoende is om de effecten van axenisch medium te onderdrukken. Dit suggereert dat de effecten van axenisch medium op de levensduur mogelijk geen gevolg zijn van een gebrek aan calorische inhoud. Het is echter niet uitgesloten dat een minder efficiënte voedselopname aan de basis ligt van het CR effect van axenisch medium. *C. elegans* is namelijk een filtervoeder,

waardoor bacteriën uit het medium zeer sterk geconcentreerd worden. Deze voedingswijze is echter niet zo geschikt voor de opname van vloeibaar medium. Ook opmerkelijk aan de samenstelling van het axenisch medium is dat het rijk is aan proteïnen en iets minder aan carbohydraten, terwijl de hoeveelheid vet beneden de detectielimiet ligt (Tabel 7.5).

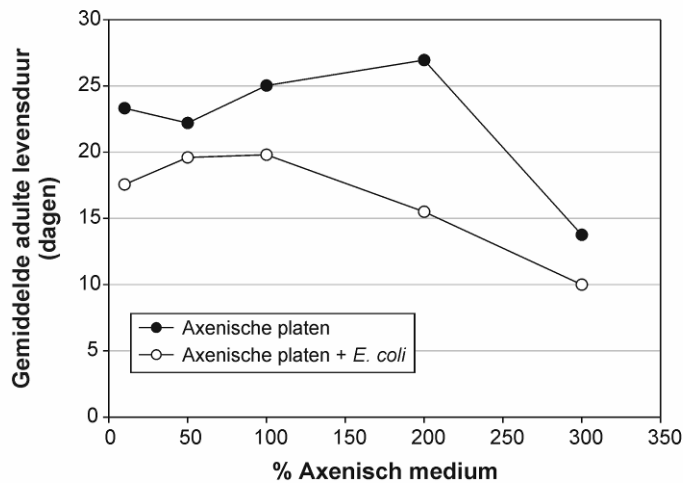
Bestanddeel	Axenisch medium	<i>E. coli</i> (OP50)
<i>Proteïnen</i>	4.6 g/100 ml	beneden detectielimiet
<i>Carbohydraten</i>	0.5 g/100 ml	beneden detectielimiet
<i>Vet</i>	beneden detectielimiet	beneden detectielimiet
<i>Vitaminen</i>		
B1	0.68 mg/100 ml	beneden detectielimiet
B2	0.12 mg/100 ml	beneden detectielimiet
B5	1.02 mg/100 ml	beneden detectielimiet
B6	0.003 mg/100 ml	beneden detectielimiet
B8	2.76 µg/100 ml	beneden detectielimiet
Niacine B3	3.96 mg/100 ml	beneden detectielimiet
<i>Mineralen</i>		
Chloride	0.1 g/100 ml	beneden detectielimiet
Calcium	8 mg/100 ml	beneden detectielimiet
Ijzer	0.2 mg/100 ml	0.1 mg/100 ml
Magnesium	4 mg/100 ml	beneden detectielimiet
Fosfor	46 mg/100 ml	6 mg/100 ml
Kalium	182 mg/100 ml	2 mg/100 ml
Natrium	61 mg/100 ml	12 mg/100 ml
Zink	0.3 mg/100 ml	beneden detectielimiet
<i>Andere</i>		
Foliumzuur	3.93 µg/100 ml	beneden detectielimiet

Tabel 7.5: Nutriëntanalyse van axenisch medium en *E. coli* (3.8×10^7 cellen/ml in water).

Om na te gaan of de vertraagde ontwikkeling en verlengde levensduur op axenisch medium een gevolg is van een te lage concentratie aan specifieke nutriënten, werd het effect van een veranderde mediumconcentratie (van 10 tot 200%) op de levensduur getest (G. Walker en D. Gems, UCL, Londen). In knaagdieren wordt een maximale levensduurverlenging geobserveerd indien de opname van voedsel verminderd wordt tot ~60% van de *ad libitum* hoeveelheid (Weindruch *et al.*, 1986). Ook in *Drosophila* veroorzaakt een voedselverdunding tot 60% van het standaard medium een maximale levensduurverlenging (Clancy *et al.*, 2002). De verwachting was dan ook dat een stapsgewijze daling in de mediumconcentratie eerst een verlenging van de levensduur zou veroorzaken naarmate het CR regime strenger werd, om bij een zeer lage mediumconcentratie een reductie van de levensduur te veroorzaken door verhongering. Er werd verwacht dat een hogere mediumconcentratie het CR effect zou verminderen en de levensduur zou verkorten.

Tegen de verwachtingen in had de concentratie aan axenisch medium weinig effect op de levensduur (Fig. 7.8). Een mediumconcentratie van 100% stemt overeen met het standaard recept. Een daling van de mediumconcentratie van 100% naar 50 of 10% veroorzaakte een lichte daling in plaats van een stijging van de levensduur ($p < 0.0001$ voor beide vergelijkingen t.o.v. 100%). Een stijging van de mediumconcentratie van 100 naar 200%

ging gepaard met een kleine verlenging van de levensduur, terwijl een mediumconcentratie van 300% een sterke daling van de levensduur veroorzaakte ($p < 0.0001$ voor beide vergelijkingen t.o.v. 100%). Dus, de levensduur-verlengende effecten van CR zijn geen gevolg van een limiterende hoeveelheid aan calorieën of de belangrijkste klassen van nutriënten (proteïnen, carbohydraten) in dit medium. Dit impliceert dat 'iets anders' wat kritiek is voor een normale voeding, afwezig is. Als een controle voor toxische effecten in deze *range* aan mediumconcentraties, die niet gerelateerd zijn met CR, werd de levensduur in deze concentratie *range* ook onderzocht in aanwezigheid van een hoeveelheid carbenicilline-behandelde *E. coli* (OP50) die de effecten van het axenisch medium kan onderdrukken (Fig. 7.8). Ook hier werd een daling van de levensduur geobserveerd bij de hoogste mediumconcentratie. Dit betekent dat de kortere levensduur van wormen op 300% axenisch medium zonder bacteriën waarschijnlijk niet veroorzaakt wordt door een onderdrukking van het CR effect door een verhoogde opname van nutriënten, maar eerder een gevolg is van een toxisch effect van het medium bij deze hoge concentratie.



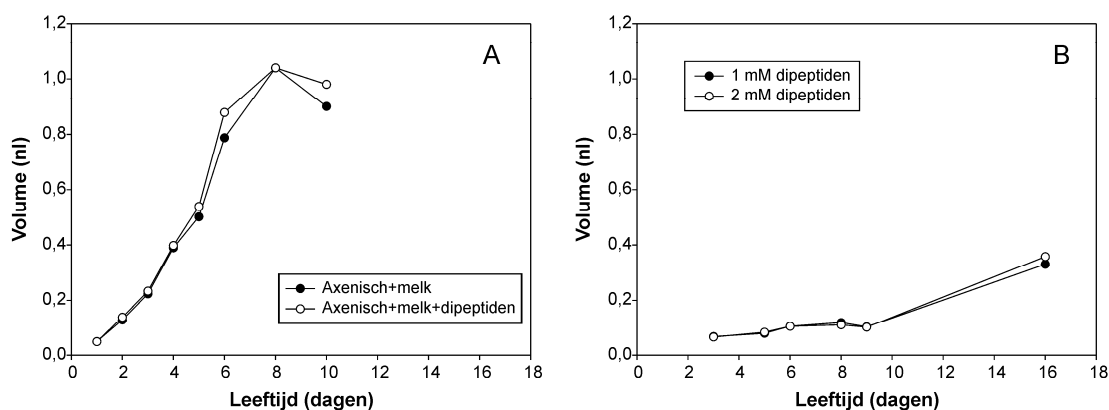
Figuur 7.8: Gemiddelde adulte levensduur op verschillende concentraties axenisch medium in agarplaten. 100% is standaard axenisch medium. Het experiment werd uitgevoerd bij 22.5°C.

Het is niet uit te sluiten dat specifieke componenten, zoals bv. bepaalde essentiële aminozuren, helemaal niet aanwezig zijn in het medium. Aminozuren worden zowel in vrije vorm, als gebonden tot dipeptiden opgenomen door de darmcellen. Van gedefinieerd axenisch medium (CbMM) is echter geweten dat het geen dipeptiden, maar enkel vrije aminozuren bevat. In deze studie werd gebruik gemaakt van semi-gedefinieerd axenisch medium op basis van gistextract en soja pepton. Wormen die in dit medium gegroeid worden, leven even lang als wormen die gekweekt worden in volledig gedefinieerd medium (F. Matthijssens en J. Vanfleteren, ongepubliceerde resultaten), wat suggereert dat beide media een gelijkaardige samenstelling hebben. Daarom werd onderzocht of ook dit semi-gedefinieerd medium een tekort heeft aan dipeptiden. Daartoe werden *glp-4* wormen opgegroeid in vloeibaar axenisch medium vanaf het L1 stadium, in aanwezigheid van een dipeptidemengsel dat alle essentiële aminozuren bevat. De samenstelling van de dipeptidemix is weergegeven in tabel 7.6. Om de effecten van dit mengsel op ontwikkelende wormen na te gaan, werden op regelmatige tijdstippen stalen genomen en het volume van de wormen bepaald. De resultaten zijn weergegeven in figuur 7.9. In een eerste experiment werden de wormen opgegroeid in axenisch medium met melk en werd

een finale dipeptide concentratie van 1 mM uitgetest (Fig. 7.9A). Uit de grafiek blijkt dat de aanwezigheid van de dipeptidemix geen invloed heeft op de ontwikkeling van de wormen. In een tweede experiment werd naast 1 mM dipeptiden ook een finale concentratie van 2 mM uitgetest (Fig. 7.9B). De interpretatie van de resultaten wordt echter bemoeilijkt door het feit dat de controle (zonder dipeptiden) verloren gegaan is door contaminatie. Bovendien werd aan de culturen geen groei-bevorderend supplement toegevoegd, waardoor de wormen slechts zeer moeilijk adult werden. Uit de grafiek is wel af te leiden dat de dipeptideconcentratie geen invloed heeft op de ontwikkeling van *C. elegans* in axenische cultuur en dat axenisch medium een supplement mist dat nodig is voor de snelle aanmaak van biomassa (deze component(en) is (zijn) wel aanwezig in *E. coli* en melk).

Dipeptide	Stockoplossing (mM)
Threonine - Leucine	100
Valine - Methionine	100
Glycine - Histidine	100
Isoleucine - Asparagine	100
Tryptofaan - Phenylalanine	100
Lysine - Lysine	100
Arginine - Phenylalanine	100

Tabel 7.6: Samenstelling van het dipeptidemengsel.



Figuur 7.9: Invloed van een dipeptidemix op het volume van *g/p-4* (24°C). (A) Vloeibaar axenisch medium met melk en 1 mM dipeptiden. (B) Vloeibaar axenisch medium zonder melk en 1 of 2 mM dipeptiden.

7.1.3.2.2 De *E. coli* component die de effecten van axenische cultuur onderdrukt is hittegevoelig en niet diffundeerbaar

E. coli blijkt dus een nutritionele component te bezitten die afwezig is in axenisch medium. In een poging om deze factor te identificeren, werden derivaten van *E. coli* getest op de mogelijkheid om de effecten van axenische cultuur te onderdrukken (G. Walker en D. Gems, UCL, Londen). Eerst werd nagegaan of de kritieke factor van *E. coli* hittegevoelig is, door geautoclaveerde bacteriën (OP50) toe te voegen aan wormen in vloeibaar axenisch medium.

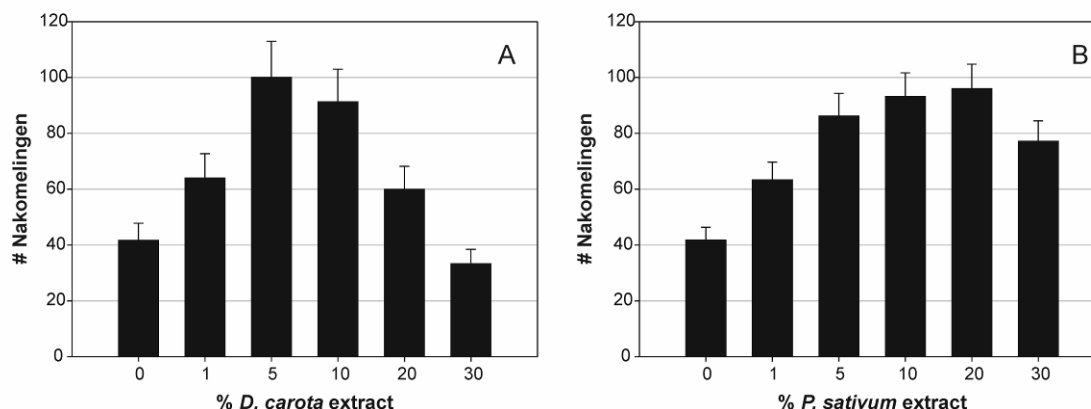
Geautoclaveerde *E. coli* was niet in staat om de gereduceerde fertiliteit en de verlengde levensduur van wormen in axenische cultuur te onderdrukken (niet getoond). Dit is in overeenstemming met eerdere experimenten met *C. elegans* in zowel vloeibaar axenisch medium, als op axenisch medium in agarplaten, waar het toevoegen van geautoclaveerde bacteriën slechts een gedeeltelijke onderdrukking van de vertraagde ontwikkeling veroorzaakte (Houthoofd *et al.*, 2002b). Dus, het kritieke bestanddeel van *E. coli* is hittegevoelig.

Vervolgens werd de mogelijkheid getest dat een oplosbare, hittegevoelige factor in *E. coli* de kritieke afwezige component is. Daartoe werd een gefiltreerd sonicaat van niet-geautoclaveerde *E. coli* (OP50) bereid. De effecten van vloeibaar axenisch medium op de fertiliteit van *C. elegans* werden niet onderdrukt door dit steriele *E. coli* extract (niet getoond). Het is echter niet uitgesloten dat het sonicaat niet voldoende geconcentreerd was om een effect te kunnen veroorzaken. De hoogste concentratie die getest werd bedroeg nl. 10^9 bact/ml, een concentratie die in monoxenische cultuur reeds aanleiding geeft tot een CR effect op de levensduur.

7.1.3.2.3 Verse organische extracten onderdrukken gedeeltelijk de effecten van axenische cultuur op ontwikkeling, fertiliteit en levensduur

Aangezien axenisch medium een verwerkt organisch product is, is het mogelijk dat het één of meer labiele organische bestanddelen mist die wel aanwezig zijn in verse organische extracten. Omdat verwacht werd dat vooral plantenextracten rijk zouden zijn aan allerlei kleine metabolieten, werden in eerste instantie twee plantenextracten, afkomstig van *Daucus carota* (wortel) en *Pisum sativum* (erwt), getest op hun capaciteit om de gereduceerde fertiliteit van wormen in vloeibaar axenisch medium te onderdrukken (G. Walker en D. Gems, UCL, Londen). Figuur 7.10A geeft de fertiliteit van *C. elegans* in vloeibaar axenisch medium weer in de aanwezigheid van een stijgende concentratie *D. carota* extract. De figuur geeft het gemiddelde van 2 replica's weer. Voor elke concentratie werden ongeveer 20 wormen opgevolgd. Het aantal nakomelingen in axenisch medium stijgt met het toevoegen van 1 of 5% *D. carota* extract ($p = 0.0098$ voor de vergelijking tussen 0 en 1% extract en $p < 0.0001$ voor de vergelijking tussen 0 en 5% extract). Het verschil in fertiliteit tussen wormen op 5 en 10% *D. carota* extract is niet significant ($p = 0.9003$). Hogere extract concentraties veroorzaken opnieuw een daling van de fertiliteit, zodat het aantal nakomelingen van wormen in axenisch medium zonder supplement niet te onderscheiden is van dat van wormen in axenisch medium met 20 of 30% *D. carota* extract ($p = 0.0526$ voor de vergelijking tussen 0 en 20% extract en $p = 0.6344$ voor de vergelijking tussen 0 en 30% extract). Figuur 7.10B geeft de fertiliteit van *C. elegans* in vloeibaar axenisch medium weer in aanwezigheid van een stijgende concentratie *P. sativum* extract. De figuur geeft het gemiddelde van 2 replica's weer. Voor elke concentratie werden ongeveer 20 wormen opgevolgd. Het aantal nakomelingen van wormen in vloeibaar axenisch medium stijgt gradueel in functie van een toenemende concentratie *P. sativum* extract ($p < 0.0001$ voor de vergelijking tussen 0% extract en alle andere extractconcentraties). De fertiliteit is maximaal bij een concentratie van 5-20% extract. Het toevoegen van een hogere concentratie *P. sativum* extract veroorzaakt opnieuw een lichte

daling van de fertiliteit ($p = 0.0213$ voor de vergelijking tussen wormen in 20 en 30% extract). Ondanks de gedeeltelijke onderdrukking van het axenisch medium effect op de fertiliteit, bleken beide plantenextracten niet in staat om ook de verlengde levensduur te onderdrukken (niet getoond).

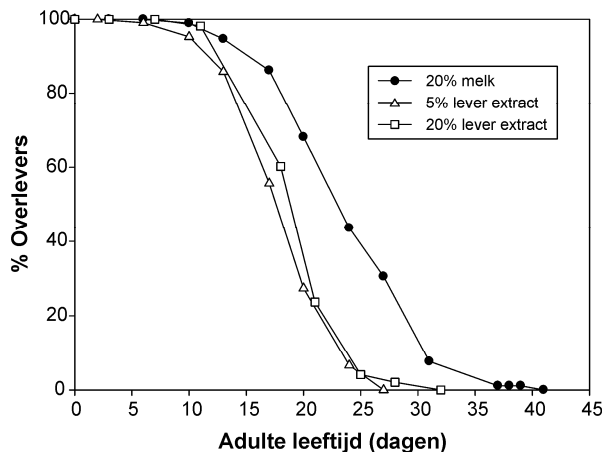


Figuur 7.10: (A) Effect van *D. carota* extract op de fertiliteit van *C. elegans* (N2) in vloeibaar axenisch medium (22.5°C). (B) Effect van *P. sativum* extract op de fertiliteit van *C. elegans* in vloeibare axenische cultuur (22.5°C). De foutenvlaggen geven de standaardfout weer.

Er werd aangetoond dat ook 20% magere melk in staat is om de groei en de fertiliteit van *C. elegans* in gedefinieerd axenisch medium te bevorderen (www.usacehr.org/cehr_medium.htm). Daarom werd nagegaan of melk ook de effecten van axenische cultuur op levensduur en fertiliteit kon onderdrukken, maar dit bleek niet het geval (F. Matthijssens en J. Vanfleteren, ongepubliceerde resultaten). Dus, in deze experimenten werd geen duidelijk bewijs gevonden voor essentiële diffundeerbare componenten in de voeding van *C. elegans*.

Meer veelbelovende resultaten werden bekomen met vers leverextract. Leverextract werd eerder gebruikt om de ontwikkeling van *C. elegans* in axenisch medium te verbeteren (Vanfleteren, 1978). Daarom werd hier het effect van leverextract op de vertraagde ontwikkeling, gereduceerde fertiliteit en verlengde levensduur van axenisch gekweekte wormen onderzocht. Wegens technische moeilijkheden bij het tellen van nakomelingen in vloeibare cultuur, werd dit experiment uitgevoerd op vaste voedingsbodems. Wild type wormen werden vanaf het L1 stadium gegroeid op axenische platen met 5% leverextract, dat een precipitaat vormde op het oppervlak van de voedingsbodems. Bij 20°C werd er een gedeeltelijke onderdrukking van de effecten van het axenisch medium vastgesteld. Zo bleek de ontwikkelingstijd te verkorten van 10 dagen op platen zonder supplement tot 3 dagen op de platen met 5% leverextract. In aanwezigheid van een hoge concentratie aan bestraalde bacteriën ontwikkelden de larven echter tot adulten in slechts 2 dagen. Wormen die gegroeid werden op axenische platen met 5% leverextract produceerden ongeveer 101 nakomelingen, terwijl wormen die gegroeid werden op axenische platen zonder bacteriën slechts 23 nakomelingen hadden. Ook hier wordt dus enkel een gedeeltelijke onderdrukking van de effecten van het axenisch medium waargenomen, aangezien goed gevoede wormen 250-300 nakomelingen kunnen produceren.

Vervolgens werd de levensduur van *glp-4;daf-16* bepaald bij 24°C in vloeibaar axenisch medium met melk of leverextract als supplement. Twee concentraties aan leverextract werden uitgetest, namelijk 5 en 20%. De ontwikkelingstijd van wormen in axenisch medium met verschillende supplementen werd vergeleken met deze van monoxenisch gekweekte dieren. Op nutriënt-agarplaten met een laagje K12 ontwikkelden L1 larven op 2 dagen tot het adulte stadium. In vloeibaar axenisch medium met 20% melk werd een ontwikkelingstijd van ongeveer 3.5 dagen vastgesteld. Wormen die gegroeid werden met 5% leverextract ontwikkelden tot adulten in ongeveer 3 dagen. In aanwezigheid van 20% leverextract tenslotte werd een ontwikkelingstijd van ongeveer 2.5 dagen geobserveerd. De resultaten van het overlevingsexperiment zijn weergegeven in figuur 7.11 en tabel 7.7.



Figuur 7.11: Overleving van *glp-4;daf-16* in vloeibaar axenisch medium met verschillende concentraties leverextract. Het experiment werd uitgevoerd bij 24°C.

Supplement	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	N	P (log-rank)
20% melk	25.1 \pm 0.7	31 \pm 0.5	-	93	-
5% LE	19.1 \pm 0.4	24 \pm 0.3	- 23.9	106	< 0.0001
20% LE	20.8 \pm 0.3	21 \pm 0.5	- 17.1	103	< 0.0001

Tabel 7.7: Overzicht van de overlevingsgegevens van *glp-4;daf-16* in vloeibaar axenisch medium. De gemiddelde adulte levensduur is uitgedrukt in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur. De wormen werden gegroeid bij 24°C.

Wormen die gegroeid werden in aanwezigheid van 20% melk hebben een gemiddelde adulte levensduur van 25 dagen. In axenisch medium met leverextract als supplement werd een gemiddelde levensduur van ongeveer 20 dagen vastgesteld, onafhankelijk van de gebruikte concentratie aan leverextract. Hoewel het verschil in gemiddelde levensduur tussen wormen die gegroeid werden in 5% of 20% leverextract significant is, is het zo klein dat het waarschijnlijk niet van betekenis is. Indien *glp-4;daf-16* gekweekt werd bij 25°C op NGM platen met een laagje OP50, werd een gemiddelde adulte levensduur van ongeveer 13 dagen vastgesteld (G. Walker, persoonlijke mededeling). Hoewel niet uit te sluiten is dat deze korte levensduur gedeeltelijk te wijten is aan de hogere temperatuur (25°C t.o.v. 24°C) van het experiment (Klass, 1977; Lakowski en Hekimi, 1996), lijken bovenstaande resultaten

aan te geven dat leverextract ook de verlengde levensduur tengevolge van axenische kweek slechts gedeeltelijk kan onderdrukken.

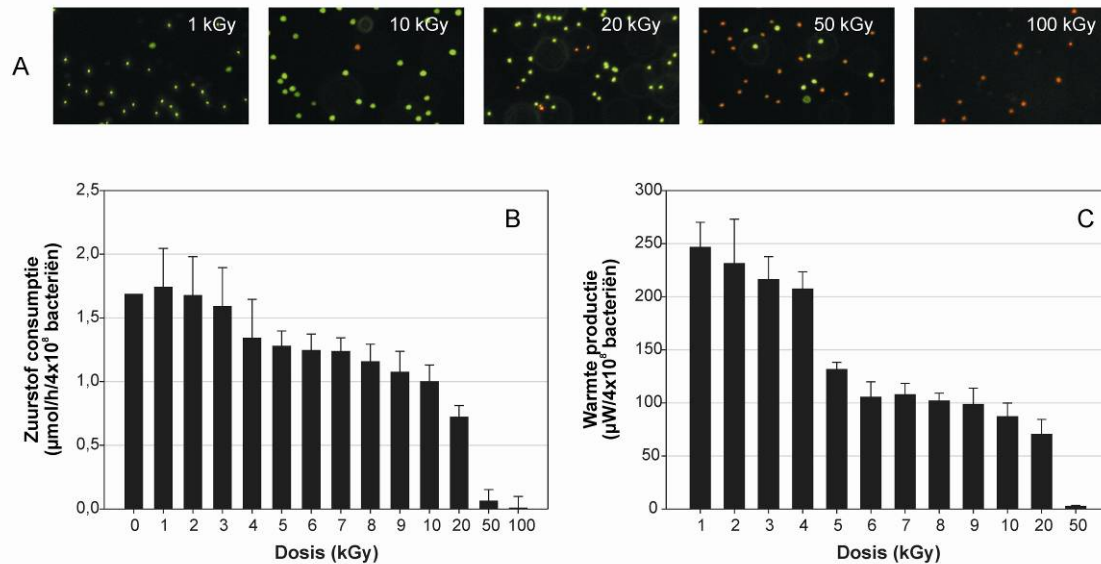
7.1.3.2.4 De onderdrukking van de axenisch medium effecten is gecorreleerd met de aanwezigheid van levende, metabool actieve E. coli

Een andere mogelijkheid is dat in *C. elegans*, naar analogie met herkauwers, levende bacteriën nodig zijn voor de vertering in de darm. De afwezigheid van levende bacteriën in axenisch medium zou dus kunnen interfereren met het normale verteringsproces in de wormen en bijgevolg ook met de opname van nutriënten. Het toevoegen van bestraalde bacteriën aan axenisch medium in agarplaten lijkt voldoende om dit defect te corrigeren. Nochtans zijn deze bacteriën niet meer in staat om te delen. Daarom werd onderzocht of de bestraalde cellen dood of slechts groei-geïnhibeerd zijn. Vervolgens werd nagegaan in hoeverre *E. coli* cellen die behandeld werden met verschillende stralingsdosissen de effecten van axenisch medium op de fertiliteit en de levensduur kunnen onderdrukken.

7.1.3.2.4.1 Karakterisering van bestraalde bacteriën

E. coli stam K12 werd bestraald met verschillende dosissen en gekarakteriseerd via een viabiliteitskleuring en door de bepaling van de zuurstofconsumptie en de warmteproductie. De cellen werden bestraald met dosissen van 1 t.e.m. 100 kGy en de verschillende parameters werden bepaald op de dag van de bestraling. Uit de viabiliteitskleuringen (Fig. 7.12A) blijkt dat bacteriën die bestraald werden met een dosis van 1 tot 10 kGy hoofdzakelijk groen kleuren en dus nog in leven zijn. Het aantal dode (rode) cellen in een cultuur neemt toe naarmate de dosis hoger wordt. Na behandeling met een dosis van 100 kGy worden zo goed als geen levende bacteriën meer aangetroffen. De culturen zijn steriel vanaf een dosis van 2 à 5 kGy.

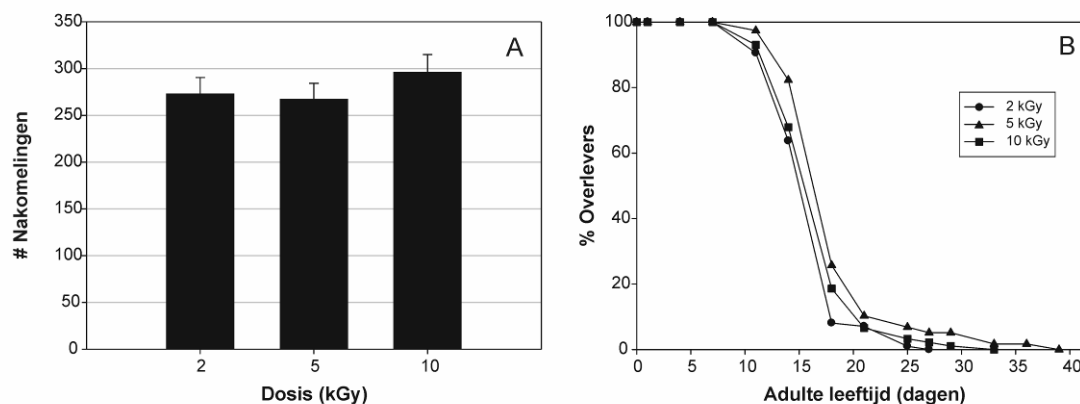
De zuurstofconsumptie is weergegeven in figuur 7.12B. Indien de bacteriën bestraald werden met een lage dosis, is er geen effect op de zuurstofconsumptie. Vanaf een dosis van 5 kGy vermindert het zuurstofverbruik. Bacteriën die bestraald werden met een zeer hoge dosis (50 of 100 kGy) vertonen een drastische verlaging van de zuurstofconsumptie. De warmteproductie is weergegeven in figuur 7.12C en vertoont eenzelfde verloop. Cellen die bestraald werden met een dosis van 100 kGy produceren geen warmte meer. Deze resultaten tonen duidelijk aan dat bestraalde bacteriën nog in leven én metabool actief zijn. De metabole activiteit vermindert echter naarmate de stralingsdosis toeneemt.



Figuur 7.12: (A) Viabiliteitskleuringen van *E. coli* K12 cellen die behandeld werden met verschillende stralingsdosisen. Groene bacteriën zijn in leven; rode bacteriën zijn dood. (B) Zuurstofverbruik van *E. coli* behandeld met verschillende stralingsdosisen. (C) Warmteproductie van *E. coli* behandeld met verschillende stralingsdosisen. De foutenvlaggen geven de standaardfout weer.

7.1.3.2.4.2 Effect van bacteriële stralingsdosis op levensduur en fertiliteit van *C. elegans*

Aangezien bestraalde bacteriën nog in leven zijn, werd nagegaan of de mate van metabole activiteit waartoe de bestraalde cellen nog in staat zijn, bepalend is voor het onderdrukken van de effecten van het axenisch medium. Vorige experimenten met bestraalde bacteriën maakten gebruik van cellen die behandeld werden met een dosis van 10 kGy. In dit experiment werd nagegaan of *E. coli* (K12) cellen die bestraald werden met een lagere (2 en 5 kGy) of een hogere (50 kGy) dosis een effect hadden op de ontwikkeling, fertiliteit en levensduur van wild type wormen. N2 werd op een hoge concentratie (2×10^9 bact/pl) aan bestraalde bacteriën gebracht vanaf het L1 stadium, en dit op zowel axenische als agar n°1 platen. Indien wormen gegroeid werden op agar n°1 platen, was er geen effect van een lagere stralingsdosis op de ontwikkelingstijd. De wormen ontwikkelden in 2 dagen tot het adulte stadium. Op agar n°1 platen met 50 kGy bacteriën ontwikkelden ze echter niet. In figuur 7.13A wordt het aantal nakomelingen van *C. elegans* op agar n°1 platen met bestraalde bacteriën weergegeven. Hieruit blijkt dat er nauwelijks een invloed van de bacteriële stralingsdosis op de fertiliteit van de wormen is, aangezien het verschil in aantal nakomelingen tussen wormen gegroeid op 5 of 10 kGy bacteriën slechts niet significant is ($p = 0.033$). Het aantal geproduceerde nakomelingen is bovendien volledig in overeenstemming met eerdere resultaten (Klass, 1977). De getoonde resultaten zijn het gemiddelde van 2 replica's. Het effect van de replica op de fertiliteit was slechts beperkt (variantie tussen replica's = 0.0067 ± 0.01). Er kon ook geen invloed van een bacteriële dosis tot 10 kGy op de levensduur van de wormen vastgesteld worden (Fig. 7.13B en Tabel 7.8). Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat een lagere stralingsdosis, en dus een hogere metabole activiteit van de bacteriële voedingsbron, geen invloed heeft op de wormen.



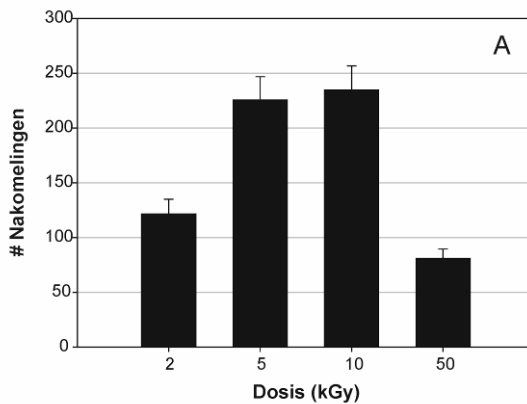
Figuur 7.13: (A) Fertiliteit van *C. elegans* in functie van de bacteriële stralingsdosis (20°C). Agar n°1 platen met 2×10^9 *E. coli* K12 cellen per plaat. De foutenvlaggen geven de standaardfout weer. (B) Overleving van *C. elegans* in functie van de bacteriële stralingsdosis (20°C). Agar n°1 platen met 2×10^9 bact/pl. Slechts één van de replica's uit tabel 7.8 wordt getoond (replica 2).

Stralingsdosis bacteriën	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	<i>N</i>	<i>p</i> (log-rank)
<i>Replica 1</i>					
2 kGy	21.1 ± 0.8	28 ± 1.1	-	98	-
5 kGy	18.8 ± 0.7	24 ± 1.2	- 10.9	112	0.035
<i>Replica 2</i>					
2 kGy	16.8 ± 0.3	18 ± 0.2	-	101	-
5 kGy	18.9 ± 0.6	21 ± 0.4	+ 12.5	60	0.001
10 kGy	17.5 ± 0.4	18 ± 0.3	+ 4.2	93	0.190
5 kGy	18.9 ± 0.6	21 ± 0.4	-	60	-
10 kGy	17.5 ± 0.4	18 ± 0.3	- 7.4	93	0.026

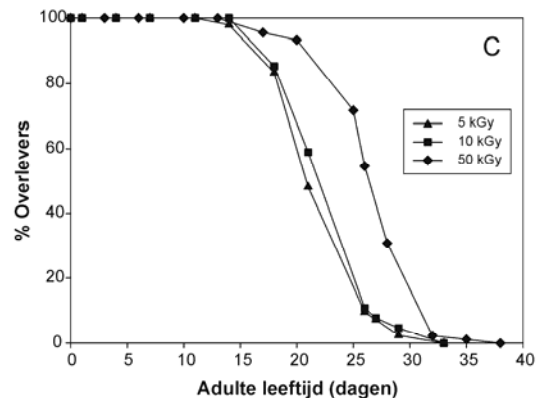
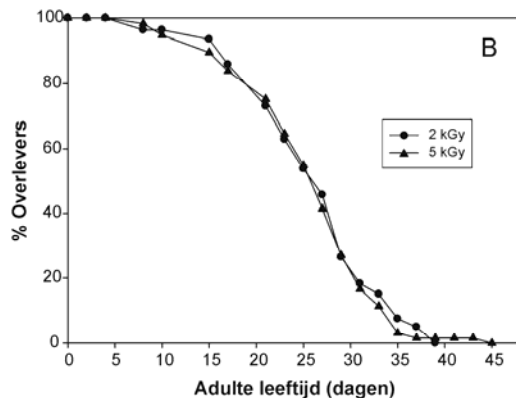
Tabel 7.8: Overzicht van de overlevingskarakteristieken bij 20°C op agar n°1 platen met 2×10^9 bestraalde bact/pl. De bacteriën werden behandeld met een dosis van 2, 5 of 10 kGy. De gemiddelde adulte levensduur is weergegeven in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur. Enkel replica 2 wordt getoond in figuur 7.13.

Indien N2 gegroeid werd op axenische platen werden grotendeels gelijkaardige resultaten bekomen. Bacteriën die bestraald werden met een dosis lager dan 10 kGy, hadden geen effect op de ontwikkelingstijd van de wormen. Wormen die gegroeid werden op axenische platen met 50 kGy bacteriën ontwikkelden, in tegenstelling tot wormen op agar n°1 platen, wel tot adulten, maar deden daar 3 dagen over, i.p.v. 2. Ze produceerden ook minder nakomelingen dan wormen op platen met 10 kGy bacteriën (Fig. 7.14A). Op 10 kGy werden 235 nakomelingen geteld; op 50 kGy slechts 81 ($p < 0.0001$). Dit suggereert dat wormen op axenische platen met 50 kGy bacteriën calorisch gerestricteerd zouden kunnen zijn. Ook op platen met 2 kGy bacteriën werden minder nakomelingen geteld dan op 5 en 10 kGy. De reden hiervoor is echter onduidelijk. De resultaten zijn het gemiddelde van 9 gedeeltelijk overlappende experimenten. Er was een klein replica-effect op de fertiliteit van de wormen

(variantie tussen replica's = 0.071 ± 0.04). In figuur 7.14B en C, en in tabel 7.9 worden de resultaten van 3 overlevingsexperimenten weergegeven. Daaruit blijkt dat, net als op agar n°1 platen, een lagere dosis geen invloed heeft op de levensduur. Een hogere dosis verlengt echter de levensduur met ongeveer 20%. Dit doet opnieuw vermoeden dat wormen op 50 kGy bacteriën gerestricteerd zijn. De slechte kwaliteit van de bacteriën (ongeveer 50% dode cellen) is daar waarschijnlijk de oorzaak van. Omdat agar n°1 platen geen voedingsstoffen bevatten, kunnen ze het tekort aan nutriënten op 50 kGy bacteriën niet opvangen. Vermoedelijk daarom ondergaan wormen op agar n°1 platen met 50 kGy bacteriën een groeistop.



Figuur 7.14: (A) Fertiliteit van *C. elegans* in functie van de bacteriële stralingsdosis (20°C). Axenisch medium in agarplaten met 2×10^9 *E. coli* K12 cellen per plaat. De foutenvlaggen geven de standaardfout weer. (B) en (C) Overleving van *C. elegans* in functie van de bacteriële stralingsdosis (20°C). Axenisch medium in agarplaten. Enkel replica 2 (B) en replica 3 (C) uit tabel 7.9 worden getoond.



Deze resultaten suggereren dat een zekere metabole activiteit van de bacteriële voedselbron inderdaad nodig is om de effecten van axenisch medium op ontwikkeling, fertiliteit en levensduur te onderdrukken. Zolang er een zekere drempelwaarde van metabole activiteit bereikt is, heeft een hogere bacteriële metabole activiteit (tengevolge van een lagere stralingsdosis) echter geen gevolgen voor *C. elegans*. Pas als de metabole activiteit van *E. coli* onder deze drempelwaarde zakt, zoals na bestraling met een dosis van 50 kGy, ondervinden de wormen hiervan gevolgen.

Stralingsdosis bacteriën	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	<i>N</i>	<i>p</i> (log-rank)
<i>Replica 1</i>					
2 kGy	25.7 \pm 0.6	29 \pm 0.4	-	73	-
5 kGy	26.3 \pm 0.6	29 \pm 0.5	+ 2.3	86	0.218
<i>Replica 2</i>					
2 kGy	26.1 \pm 0.7	31 \pm 0.6	-	98	-
5 kGy	25.9 \pm 0.7	31 \pm 0.6	- 0.8	101	0.645
<i>Replica 3</i>					
5 kGy	23.2 \pm 0.4	26 \pm 0.4	-	85	-
10 kGy	24.0 \pm 0.5	26 \pm 0.4	+ 3.4	65	0.248
50 kGy	27.7 \pm 0.4	32 \pm 0.2	+ 19.4	88	< 0.0001
10 kGy	24.0 \pm 0.5	26 \pm 0.4	-	65	-
50 kGy	27.7 \pm 0.4	32 \pm 0.2	+ 15.4	88	< 0.0001

Tabel 7.9: Overzicht van de overlevingskarakteristieken bij 20°C op axenische platen met 2x10⁸ bestraalde bact/pl. De bacteriën werden behandeld met een dosis van 2, 5, 10 of 50 kGy. De gemiddelde adulte levensduur is weergegeven in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur. Enkel replica 2 en 3 worden getoond in figuur 7.14, aangezien de eerste twee replica's identieke resultaten opleverden.

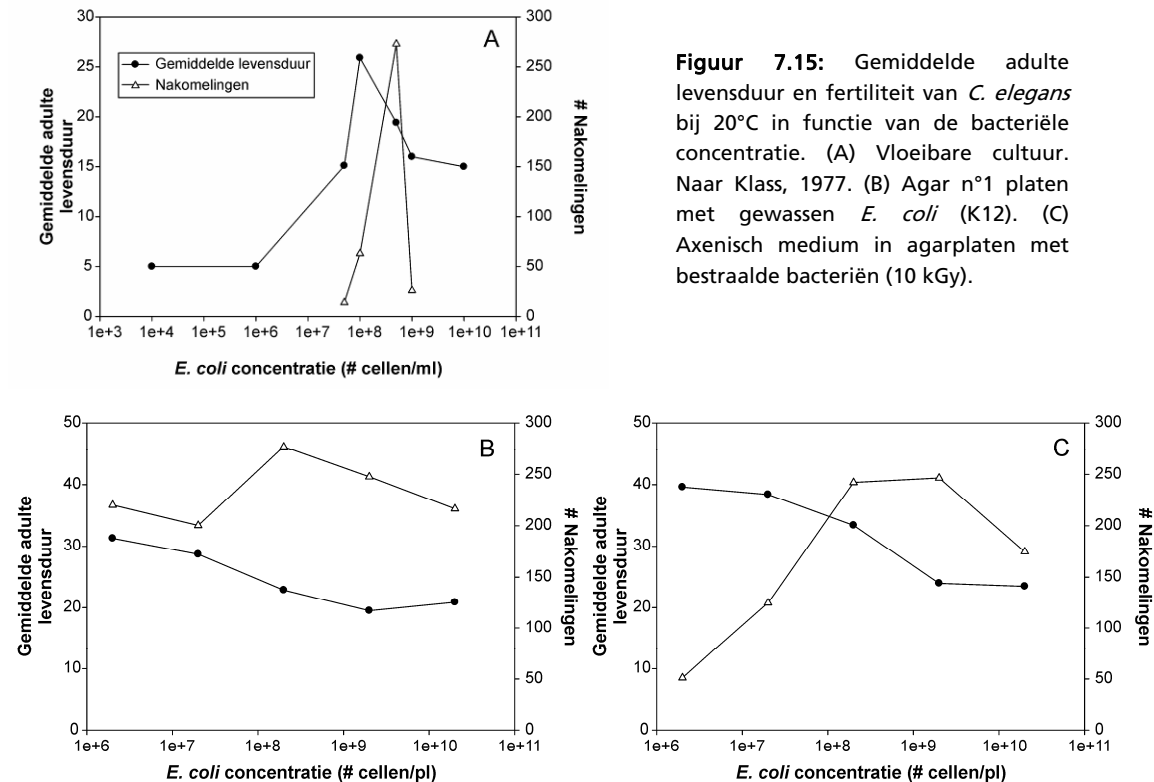
7.1.4 Discussie

7.1.4.1 Evaluatie van de nieuwe plaatmethoden voor CR

7.1.4.1.1 CR en levensduur

De ideale methode om *C. elegans* te onderwerpen aan CR was tot hiertoe nog niet voorhanden. De studie van CR in deze nematode wordt namelijk bemoeilijkt door de manier waarop wormen gewoonlijk gekweekt worden in het laboratorium. Omdat *E. coli* de enige voedselbron is, is het niet mogelijk om het aantal calorieën te verlagen zonder de beschikbaarheid van specifieke nutriënten daarbij te beïnvloeden. Hierdoor worden eventuele positieve effecten van voedselrestrictie mogelijk teniet gedaan door ondervoeding. Dit wordt mooi geïllustreerd door de resultaten van Klass (1977) die *C. elegans* restricteerde door de concentratie aan bacteriën te verdunnen in buffer. Figuur 7.15A toont hoe de fertiliteit en de gemiddelde levensduur evolueren in functie van een dalende voedselconcentratie. Bemerk dat de *E. coli* concentratie voor maximale reproductie een factor 10 hoger ligt dan deze voor maximale levensduur. De levensduur kan slechts verlengd worden over een zeer nauwe *range* aan voedselconcentraties, wat technisch niet erg praktisch is. Concentraties lager dan 10⁸ bact/ml veroorzaken een reductie van de levensduur tengevolge van verhongering. Gelijkaardige effecten op levensduur en fertiliteit

werden ook geobserveerd bij gerestriceerde fruitvliegen (Chapman en Partridge, 1996) en werden nog meermaals bevestigd in vloeibare bacteriële cultuur in *C. elegans* (Houthoofd *et al.*, 2003a; Bishop en Guarente, 2007; Panowski *et al.*, 2007). Een geschikte methode om wormen te onderwerpen aan CR zou daarom de opname van voedsel moeten reduceren over een brede *range* aan concentraties, zonder daarbij ondervoeding te veroorzaken. Dit zou gepaard moeten gaan met een substantiële verlenging van de levensduur.



Bovenstaande resultaten beschrijven nieuwe methoden voor CR in *C. elegans* op basis van vaste voedingsbodems. Eén methode maakt gebruik van agar n°1 platen (zonder nutriënten) met daarop dalende concentraties aan gewassen bacteriën. Deze benadering is in essentie identiek aan deze van Klass (1977). Omdat wormen die via deze methode onderworpen worden aan CR bijgevolg ook vatbaarder zouden kunnen zijn voor ondervoeding, werden eveneens methoden uitgewerkt op basis van axenisch medium met groei-geïnhibeerde bacteriën. Omdat axenisch medium rijk is aan nutriënten, zouden wormen op deze platen geen ondervoeding mogen ondervinden. In figuur 7.15B en C worden voor de methode met agar n°1 platen en de methode met axenisch medium in agarplaten met bestraalde bacteriën de gemiddelde levensduur en het aantal nakomelingen in functie van de voedselconcentratie weergegeven. In tegenstelling tot de verdunning van bacteriën in buffer, is er op vaste voedingsbodems geen duidelijke optimale voedselconcentratie voor maximale levensduur. Deze blijft zowel op voedingsbodems zonder nutriënten, als op axenisch medium in agarplaten stijgen met dalende *E. coli* concentratie. Hoewel een *E. coli* concentratie van 2×10^6 bact/pl zeer weinig is, blijkt dit toch nog voldoende om een positief effect op de levensduur te hebben. Dit is niet onlogisch op axenische platen (wegens de nutriëntrijke samenstelling van het medium), maar lijkt

contradictorisch op agarplaten zonder voedingsstoffen. Het is niet uit te sluiten dat een beperkte (niet zichtbare) groei van *E. coli* op deze platen toch nog mogelijk is, waardoor de werkelijke concentratie aan bacteriën iets hoger is.

De optimale bacterieconcentratie voor de fertiliteit bedraagt voor beide methoden 2×10^8 à 2×10^9 bact/pl. Omdat de optimale voedselconcentraties voor levensduur en fertiliteit in vloeibare cultuur verschillend zijn, veroorzaakt een stijging van de optimale voedselconcentratie voor de levensduur in eerste instantie een verhoogde fertiliteit (Fig. 7.15C) (Klass, 1977). Dit wordt ook waargenomen bij *D. melanogaster* (Fig. 5.4) (Chapman en Partridge, 1996). Een vroege hypothese over het mechanisme van CR suggereert dat de verlengde levensduur als respons op CR in modelorganismen een gevolg zou kunnen zijn van het opheffen van een toxisch effect van een te hoge voedselopname, eigen aan laboratoriumomstandigheden (Sinclair, 2005). Dit zou betekenen dat een gerespecteerde voedselopname in het laboratorium de situatie van dieren in het wild veel beter benadert dan de normale *ad libitum* condities. Bijgevolg kan men zich de vraag stellen of de studie van CR wel kan bijdragen aan het begrijpen van het normale verouderingsproces, indien deze interventie in laboratorium-organismen slechts aanleiding zou geven tot het verminderen van allerlei pathologieën die geassocieerd zijn met over-eten. Een stijgend aantal nakomelingen in aanwezigheid van een dalende voedselconcentratie zou hiervan een indicatie kunnen zijn. Een dergelijk effect wordt inderdaad waargenomen bij de nieuwe plaatmethoden tussen concentraties van 2×10^{10} en 2×10^9 bact/pl. Een toxisch effect van de voedselconcentratie moet hier echter geïnterpreteerd worden als een mogelijke productie van levensduurverkortende toxines door de *E. coli* cellen. Wanneer de *E. coli* concentratie echter daalt voorbij het optimum voor de fertiliteit, gaat de verlenging van de levensduur ook gepaard met een daling van het aantal nakomelingen. Dit pleit tegen de hypothese van over-eten. Ook in muizen zijn er geen bewijzen gevonden die deze hypothese ondersteunen (Pugh *et al.*, 1999b; Austad en Kristan, 2003).

Recent werden door twee afzonderlijke laboratoria methoden voor CR in *C. elegans* ontwikkeld op basis van NGM platen (Kaeberlein *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). De wormen werden opgegroeid op NGM platen met ampicilline- (Lee *et al.*, 2006) of UV-behandelde (Kaeberlein *et al.*, 2006) bacteriën. Op het moment dat de dieren het adulte stadium bereikten, werden ze overgebracht naar NGM platen zonder bacteriën. Dit resulteerde in een verlenging van de levensduur met 30 (Lee *et al.*, 2006) tot 50% (Kaeberlein *et al.*, 2006). Gegevens over fertiliteit of grootte zijn niet beschikbaar. Hoewel de auteurs van beide artikels beweren dat de wormen onder studie niet gerespecteerd, maar wel verhongerd waren, kan hierover gediscussieerd worden, aangezien NGM platen 0.25% pepton bevatten (zie ook 7.4). Bovendien suggereren onze resultaten een mogelijke alternatieve verklaring, namelijk dat de levensduurverlenging in deze protocols het resultaat is van de afwezigheid van *E. coli*, zoals in de axenische plaatmethoden die hier beschreven worden.

7.1.4.1.2 CR en fertiliteit

Bovenstaande resultaten tonen aan dat de verlengde levensduur van *C. elegans* op axenische platen met een zeer dunne laag bestraalde (10 kGy) bacteriën (2×10^7 – 2×10^6 bact/pl) gepaard gaat met een reductie van het aantal nakomelingen met 50 à 80%. Dit is in overeenstemming met een eerder rapport waar een viervoudige vermindering van het aantal nakomelingen werd vastgesteld indien de bacteriële voedselbron verdund werd in buffer (Klass, 1977). Ook in andere organismen werd vastgesteld dat CR gepaard gaat met een verminderde fertiliteit. In *Drosophila* veroorzaakt CR, net als bij *C. elegans*, een verminderde productie van het aantal nakomelingen (Chippindale *et al.*, 1993; Chapman en Partridge, 1996). In ratten leidt CR tot een uitstel van de reproductieve maturiteit (Holehan en Merry, 1985).

Omdat voeding, reproductie en levensduur zo sterk met elkaar verweven lijken, werd gesuggereerd dat een verminderde fertiliteit als respons op CR zou geëvolueerd zijn als een mechanisme om zichzelf in stand te houden tijdens perioden van schaarste (Shanley en Kirkwood, 2000; Kirkwood en Shanley, 2005). Wanneer de omgevingscondities gunstig zijn, wordt bij voorkeur energie geïnvesteerd in reproductie, terwijl in perioden van schaarste, als de overlevingskansen voor de nakomelingen klein zijn, zelfbehoud bevordert wordt, tot wanneer de condities verbeteren en reproductie kan hervat worden. Deze hypothese impliceert dat een gereduceerde fertiliteit noodzakelijk is voor de verlengde levensduur tengevolge van CR. In *C. elegans* blijkt echter dat de verlengde levensduur op agarplaten zonder nutriënten en een lage concentratie aan bacteriën, niet gepaard gaat met een drastische reductie van de fertiliteit. Op 2×10^7 en 2×10^6 bact/pl werden slecht 20 tot 30% minder nakomelingen geteld dan op 2×10^8 bact/pl. Een studie in *D. melanogaster* die tot doel had de invloed van reproductie op de levensduur van gerespecteerde vliegen na te gaan, kwam tot de conclusie dat een verminderde reproductie niet noodzakelijk is voor de levensduurverlenging door CR in *Drosophila*. Zo bleken steriele *ovo* vrouwtjes, ondanks de afwezigheid van oögenese en vitellogenese, normaal te kunnen reageren op CR (Mair *et al.*, 2004). Zeer recent werd aangetoond dat een milde vorm van CR (20% gereduceerde opname van voedsel i.p.v. de gebruikelijke 30 – 60%) geen invloed had op de fertiliteit van ratten (Rocha *et al.*, 2007), hoewel de positieve effecten van milde CR op gezondheid en levensduur wel degelijk gedocumenteerd zijn (Weindruch *et al.*, 1986; Seo *et al.*, 2006).

Dus, de verlengde levensduur tengevolge van CR is niet éénduidig het gevolg van een wijziging in de allocatie van energiereserves van reproductie naar levensbehoud. Dit is in overeenstemming met verschillende insuline/IGF-1 *pathway* mutanten van *C. elegans* (Johnson *et al.*, 1993; Kenyon *et al.*, 1993; Gems *et al.*, 1998), *D. melanogaster* (Hwangbo *et al.*, 2004) en knaagdieren (Vergara *et al.*, 2004; Partridge *et al.*, 2005) die ook een verlengde levensduur hebben zonder duidelijke kost van reproductie. Voorzichtigheid is echter geboden met de interpretatie van deze resultaten, aangezien een verlengde levensduur toch gepaard kan gaan met een verminderde fitheid die op het eerste zicht niet waarneembaar is (Walker *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 2004; Partridge *et al.*, 2005).

7.1.4.1.3 CR en lichaamsgrootte

Het volume van wild type wormen daalt onveranderlijk in functie van een dalende concentratie aan bacteriën. Deze kleinere lichaamsgrootte is zowel een gevolg van een kleinere lengte, als van een gereduceerde breedte. Ook andere modelorganismen, zoals *D. melanogaster* en knaagdieren, die onderworpen worden aan CR zijn kleiner dan goed gevoede controles (Miller *et al.*, 2002; Tu en Tatar, 2003). Bovenstaande resultaten zijn in overeenstemming met recente gegevens van Mörck en Pilon (2006) die de lengtes en breedtes onderzochten van wormen met een variëteit aan voedingsdefecten. Verschillende signaaltransductiepaden in *C. elegans* zijn verantwoordelijk voor de regulatie van de lichaamsgrootte. Zowel TGF- β signalisatie (Savage-Dunn, 2001; Savage-Dunn *et al.*, 2003), als de spectrine (McKeown *et al.*, 1998; Norman en Moerman, 2002) en calcineurine (Bandyopadhyay *et al.*, 2002) *pathways* blijken hierbij een rol te spelen. Door gebruik te maken van dubbelmutanten werd echter aangetoond dat het effect van de gereduceerde voedselopname op de lengte onafhankelijk van deze *pathways* gereguleerd wordt. Bovendien stapelden de gerespecteerde mutanten minder vet op en vertoonden ze een verhoogde autofagie (Mörck en Pilon, 2006). De auteurs veronderstellen daarom dat in mutanten met een voedingsdefect het programma voor de vorming van dauers gedeeltelijk geactiveerd wordt (maar niet via TGF- β), zodat de groei van de wormen vertraagt.

In *D. melanogaster* veroorzaken mutaties in zowel de insuline/IGF-1 als de TOR *pathway* een reductie van de grootte die volledig een gevolg is van een verminderde celgrootte (Neufeld, 2003). Omdat verhoogde autofagie ook een gevolg is van verminderde TOR signalisatie en omwille van de vermoedelijke betrokkenheid van de TOR *pathway* bij de levensduurverlenging tengevolge van CR in *C. elegans* (Hansen *et al.*, 2007), is het niet uitgesloten dat dit signaaltransductiepad ook betrokken is bij de regulatie van celgrootte in respons op de beschikbare hoeveelheid voedsel in de worm.

7.1.4.2 Groei van *C. elegans* in axenische cultuur reflecteert een noodzaak voor nutriënten aanwezig in metabool actieve *E. coli*

Bovenstaande resultaten suggereren dat CR in axenisch medium een tekort aan kritieke nutritionele componenten reflecteert die enkel aanwezig zijn in metabool actieve *E. coli*. In principe zijn er meerdere mechanismen mogelijk die de levensduur van *C. elegans* zouden kunnen verlengen in axenisch medium. Zoals vermeld in Hoofdstuk 4.3.5.2 draagt o.a. de afwezigheid van bacteriële infecties bij aan de verlengde levensduur in axenische cultuur. Er werd namelijk vastgesteld dat *E. coli*, de normale voedselbron van *C. elegans* in het laboratorium, lichtjes toxisch en infectueus is (Croll *et al.*, 1977; Gershon en Gershon, 2002). Dit verklaart echter niet alles. Wanneer wormen gevoed worden met bacteriën die gedood werden door ultraviolette bestraling of antibiotica veroorzaakt dit een verlenging van de levensduur met 20-40% (Gems en Riddle, 2000b; Garigan *et al.*, 2002). De levensduurverlenging tengevolge van kweek in axenisch medium bedraagt echter 60-80%. Een tweede interpretatie is dat axenisch medium deficiënt is in één van de grote klassen van voedingsstoffen (bv. lipiden, carbohydraten of proteïnen). De nutriëntanalyse van het axenisch medium spreekt dit echter tegen. Hoewel het vetgehalte zeer laag is, is dit ook het

geval voor een *E. coli* suspensie die in staat is de effecten van het axenisch medium volledig te onderdrukken, wat tegen een tekort aan vetten pleit. Verder had het variëren van de concentratie aan axenisch medium van 10 tot 200% van het standaard recept slechts een beperkte invloed op de levensduur. Ook een dipeptidemengsel dat alle essentiële aminozuren bevatte kon de effecten van axenische cultuur op de groei van *C. elegans* niet onderdrukken, wat vermoedelijk betekent dat de dipeptideconcentratie in het medium niet limiterend is voor de nematoden. Tesaamen tonen deze resultaten aan dat de verlengde levensduur van *C. elegans* in axenisch medium geen gevolg is van een tekort aan één van de belangrijkste klassen van nutriënten.

Bovenstaande resultaten suggereren echter de onverwachte conclusie dat levende bacteriën een noodzakelijk onderdeel van de voeding zijn voor *C. elegans* en dat hun afwezigheid in axenische cultuur leidt tot een streng CR regime. In overeenstemming hiermee werd zeer recent aangetoond dat wormen die gegroeid werden op *E. coli* met een aangetast respiratorisch metabolisme een verlengde levensduur hebben (R. Saiki, A. Luncford, P.L. Larsen en C.F. Clarke, persoonlijke mededeling). Hoe levende bacteriën zouden kunnen bijdragen aan de voeding van *C. elegans* is niet gekend. De aanwezigheid van een complexe gemeenschap van intestinale micro-organismen is essentieel voor de voeding van veel grotere bodeminvertebraten, zoals termieten, isopoden en regenwormen (Konig, 2006). Deze helpen bij de vertering van moeilijk afbreekbare biologische materialen zoals cellulose en chitine. Dus, indien een termiet zou kunnen gekweekt worden in axenische cultuur, kan verwacht worden dat dit zou leiden tot een verminderde voedselopname. Een mogelijkheid is dat *C. elegans* voor zijn vertering wordt bijgestaan door micro-organismen in zijn darm. Gezien de overmaat aan nutriënten in axenisch medium is het echter onwaarschijnlijk dat de vrijstelling van voedingsstoffen door de activiteit van *E. coli* in deze omstandigheden belangrijk is. Een meer plausibele interpretatie is dat de noodzaak voor levende bacteriën een gevolg is van het feit dat de darm van *C. elegans* geëvolueerd is in de constante aanwezigheid van intestinale micro-organismen en dat deze daarom vereist zijn voor de normale darmfunctie. In het wild zouden deze darmbacteriën de vertering van andere voedselcomponenten, zoals bv. schimmels en protozoa, kunnen vergemakkelijken.

Intacte *E. coli* cellen worden slechts sporadisch geobserveerd in de darm van gefixeerde wormen door middel van elektronenmicroscopie (G. Borgonie, persoonlijke mededeling), wat schijnbaar pleit tegen onze hypothese. Levende wormen kunnen echter veel meer intacte bacteriën in hun darm hebben, die verloren gaan tijdens het proces van fixatie. Föll en collega's (1999) bepaalden het aantal levende *E. coli* cellen in de darm van *C. elegans* na sucrosewassing door een verbrijzeld worm-staal te incuberen op *full medium* agarplaten bij 37°C en de resulterende kolonies te tellen. Deze benadering leverde een totaal van 3.4 µg FW (*Fresh Weight*) *E. coli* per mg FW *C. elegans*. Dit komt overeen met ~3900 levende *E. coli* cellen in de darm van een jong-adulte worm, uitgaande van een FW van respectievelijk ~2x10⁻⁶ µg en ~2.3 µg. Een gelijkaardige mogelijkheid is dat bacteriële componenten die opgenomen werden door endocytose een zekere biochemische activiteit behouden, die bijdraagt aan de vertering in de intestinale cellen van de wormen. Een andere mogelijkheid is dat de intestinale micro-organismen de nutriënten-transportmechanismen beïnvloeden. In *C. elegans* spelen pH gradiënten over de apicale membraan van de intestinale cellen een belangrijke rol in de opname van voedingsstoffen, bv. door oligopeptidetransporters. Het

uitschakelen van dit transportsysteem door mutatie veroorzaakt fenotypische effecten gelijkaardig aan CR, zoals o.a. een verlengde levensduur (Nehrke, 2003).

Hoewel bovenstaande resultaten suggereren dat metabool actieve bacteriën een noodzaak zijn voor de normale voeding van *C. elegans*, zijn alternatieve interpretaties mogelijk. Zo is niet uit te sluiten dat de potentiële effecten van de stralingsdosis niet gekoppeld zijn aan de metabole activiteit van de bacteriën, maar wel aan de mate waarin een groei-bevorderende component van *E. coli* intact is na bestraling. Het blijft ook mogelijk dat één of meer zeer labiele bestanddelen met hoog moleculair gewicht kritiek zijn voor de voeding van de nematoden. Vroegere studies suggereerden dat de opname van nutriënten door de darmcellen van *C. elegans* in aanzienlijke mate door pinocytose gebeurt (Vanfleteren, 1974, Vanfleteren, 1980). De opname van nutriënten blijkt namelijk gestimuleerd te worden door de aanwezigheid van partikels in het kweekmedium (Vanfleteren, 1974; Cheng *et al.*, 1979). Deze partikels zijn afwezig in axenisch medium. Dat verschillende plantenextracten de effecten van axenische cultuur slechts in zeer beperkte mate kunnen onderdrukken, zou kunnen betekenen dat *C. elegans* een voedselsupplement nodig heeft dat bestaat uit partikels. De vaststelling dat het toevoegen van leverextract de effecten van het axenisch medium, althans gedeeltelijk, kan onderdrukken is alvast in overeenstemming met een eerdere studie in *C. briggsae* waarin aangetoond werd dat de mogelijkheid van glycogeen om groei en reproductie te bevorderen, geassocieerd is met het geprecipiteerde deel van het volledige medium (Hansen *et al.*, 1971). Het is echter niet uit te sluiten dat de effecten van leverextract op ontwikkeling, fertiliteit en levensduur een gevolg zijn van de aanwezigheid van een specifieke groei-bevorderende component die ontbreekt in het axenisch medium. Indien *E. coli* de wormen voorziet van particulier materiaal dat bevorderlijk is voor de vertering, dan werd hier aangetoond dat dit hittegevoelig is.

Hogerop werd gesuggereerd dat de CR effecten van axenisch medium een noodzaak reflecteren voor een voedselcomponent aanwezig in metabool actieve bacteriën. Als deze component voorhanden is, worden ontwikkeling en fertiliteit gestimuleerd en verkort de levensduur. De levensduurverkortende effecten van deze component zouden kunnen beschouwd worden als een bijproduct van de processen die het ondersteunt (bv. moleculaire schade), of als een secundaire toxiciteit van de voedselcomponent zelf. Een alternatieve mogelijkheid is dat metabool actieve *E. coli* *C. elegans* voorziet van twee verschillende elementen, nl. een nutriënt dat ontwikkeling en fertiliteit stimuleert en een toxische component of eigenschap die een verkorting van de levensduur veroorzaakt. Verschillende observaties uit deze studie ondersteunen de tweede visie. Ten eerste is de *E. coli* concentratie die nodig is voor een normaal aantal nakomelingen tien maal lager dan deze die een korte levensduur veroorzaakt (figuur 7.4 en 7.5). Ten tweede konden plantenextracten wel ontwikkeling en fertiliteit ondersteunen, maar hadden ze geen effect op de levensduur (figuur 7.10).

Onze resultaten zouden kunnen suggereren dat CR in *C. elegans* tengevolge van groei op axenisch medium in agarplaten verschillend is van CR methoden in andere modelorganismen. In *Drosophila* werd bv. aangetoond dat axenische kweek geen invloed had op de levensduur (Ren *et al.*, 2007). Er zijn echter observaties die suggereren dat de

mechanismen die aan de basis liggen van de levensduurverlenging tengevolge van CR toch niet zo verschillend zijn tussen wormen en zoogdieren. Zo blijken kiemvrije knaagdieren, net als CR knaagdieren minder te wegen en hebben ze een verlengde levensduur (Snyder *et al.*, 1990; Tazume *et al.*, 1991). Bovendien werden geen additieve effecten op de levensduur vastgesteld wanneer kiemvrije dieren onderworpen werden aan CR, wat suggereert dat in kiemvrije en CR dieren de levensduur verlengt via gelijkaardige mechanismen. In overeenstemming hiermee nam de reproductieve capaciteit van kiemvrije muizen toe na contaminatie met darmbacteriën (Shimizu *et al.*, 1998). Dit wordt ook geobserveerd in *C. elegans* na toevoegen van bestraalde *E. coli* aan het axenisch medium in agarplaten (figuur 7.5).

7.1.5 Besluit

In deze studie werden nieuwe en handige methoden ontwikkeld voor CR, gebruik makend van axenisch medium in agarplaten. Deze methoden werden gebruikt om de mechanistische basis van CR in axenisch medium te ontrafelen. Hoewel de respons op CR naar vertraagde ontwikkeling, verminderde fertiliteit en verlengde levensduur toe, wijdverspreid is in een variëteit aan organismen, is het onduidelijk in hoeverre de onderliggende mechanismen evolutief geconserveerd zijn. Onze resultaten suggereren een noodzaak voor metabool actieve bacteriën in de voeding van *C. elegans*. Dit impliceert een CR mechanisme waarvan de evolutieve conservatie momenteel niet duidelijk is.

7.2 Evaluatie van *eat* mutanten als model voor calorische restrictie in *C. elegans*

7.2.1 Inleiding

eat mutanten vertonen neuronale en musculaire defecten die interfereren met de werking van de farynx, wat leidt tot een vertraagde ontwikkeling en een verhongerd uiterlijk (Avery, 1993; McKay *et al.*, 2004). Een aantal *eat* mutanten heeft bovendien een verlengde levensduur. Zo leven *eat-1(ad427)*, *eat-2(ad1116)* en *eat-6(ad467)* respectievelijk 33, 57 en 37% langer dan wild type wormen (Lakowski en Hekimi, 1998). Sinds deze publicatie is het gebruik van *eat* mutanten (gewoonlijk *eat-2(ad1116)* of *eat-2(ad465)*) als model voor CR wijdverspreid. Andere rapporten tonen echter aan dat verschillende *eat* mutanten pleiotrope effecten hebben; *eat-2* is hypersensitief voor een cholinergische agonist, *eat-3* sterft bij het verlaten van het dauerstadium, *eat-6* is hypersensitief voor Na/K ATPase inhibitoren, *eat-7* beweegt niet en *eat-18* heeft een defecte cholinergische neurotransmissie (Hodgkin, 1997; Gershon en Gershon, 2002). Verder is er een grote variatie in de gerapporteerde levensduur van verschillende *eat-2* allelen. Sommige laboratoria slaagden erin de verlengde levensduur van deze mutanten te bevestigen (Hsu *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004), terwijl anderen veel kleinere verschillen in levensduur observeerden in vergelijking met wild type wormen (Walker *et al.*, 2005; Curtis *et al.*, 2006; Kaeberlein *et al.*,

2006). Nog anderen zagen geen verschillen in levensduur (Houthoofd *et al.*, 2005c; Henderson *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Hoewel de verlengde levensduur van *eat-2* in sommige gevallen reproduceerbaar bleek, was dit niet het geval voor andere *eat* mutanten, zoals *eat-1* of *eat-6* (Walker *et al.*, 2005). Dit probleem van reproduceerbaarheid bemoeilijkt uiteraard de studie van de mechanismen die aan de basis liggen van CR en doet de vraag rijzen of het gebruik van alternatieve methoden niet aangewezen is. Een mogelijke verklaring is dat deze mutanten gerestricteerd zijn afhankelijk van de omgevingscondities, zoals de dikte van de laag bacteriën op de agarplaten. Een waarneming die deze hypothese ondersteunt is dat sommige *eat* mutanten langlevend zijn in vloeibare monoxenische cultuur, maar niet op vaste voedingsbodems (Houthoofd *et al.*, 2005c). Dit suggereert dat de gereduceerde opname van *E. coli* door de *eat* mutanten niet limiterend is als ze gegroeid worden in aanwezigheid van een overmaat aan bacteriën op agarplaten. Deze hypothese werd onderzocht door de levensduur van drie verschillende *eat* mutanten te bepalen in aanwezigheid van verschillende concentraties aan groei-geïnhibeerde bacteriën. In één experiment werd ook nagegaan of de voedselconcentratie een invloed had op de fertiliteit en het volume van de mutanten. Om na te gaan of het effect van een *eat* mutatie op de levensduur genspecifiek zou kunnen zijn, werd in deze studie gebruik gemaakt van drie verschillende *eat* mutanten. Bij onderzoek naar CR wordt meestal enkel de *eat-2* mutant gebruikt, omdat dit de enige mutant is die gewoonlijk langer leeft. Deze aanpak leidt echter tot het risico dat de geobserveerde interacties met *eat-2* eigen zijn aan deze welbepaalde mutant en niet algemeen gerelateerd zijn met CR.

7.2.2 Materiaal en methoden

In deze studie werd gebruik gemaakt van de wild type stam N2 en drie verschillende *eat* mutanten: *eat-1(ad427)*, *eat-2(ad1116)* en *eat-6(ad467)*. De exacte functie van EAT-1 is voorlopig nog onduidelijk, maar vermoed wordt dat het eiwit een rol speelt bij de verankering van actinefilamenten in de spieren (McKeown en Beckerle, 2001; McKeown *et al.*, 2006). Het *eat-2* gen codeert voor een nicotine-acetylcholinereceptorsubunit en mutanten in dit gen hebben een defecte neurotransmissie, wat de pompsnelheid van de farynx beïnvloedt (Raizen *et al.*, 1995; McKay *et al.*, 2004). *eat-6* tenslotte codeert voor een Na,K-ATPase subunit die voornamelijk actief is in de spieren (Davis *et al.*, 1995).

Om het effect van de voedselconcentratie op de levensduur van een aantal *eat* mutanten na te gaan, werden drie concentraties aan bacteriën uitgetest, namelijk 2×10^{10} , 2×10^9 en 2×10^8 bact/pl. Wormen werden in verschillende omstandigheden gekweekt. Enerzijds werd gebruik gemaakt van agar n°1 platen (zonder nutriënten) in aanwezigheid van verschillende concentraties gewassen bacteriën (*E. coli* stam K12). Anderzijds werden wormen onder meer standaard condities gekweekt, op NGM platen met *E. coli* stam OP50, in aanwezigheid van het antibioticum carbenicilline. Welke kweekmethode gebruikt werd, wordt per experiment duidelijk aangegeven. Bij de overlevingsexperimenten op agar n°1 platen werd 50 μ M FudR toegevoegd op het moment dat de wormen het adulte stadium naderden. Op NGM platen met carbenicilline-behandelde *E. coli* werd 100 μ M FudR gebruikt. Er werd 200 μ M FudR toegevoegd aan de NGM platen met delende OP50. De dag waarop FudR werd toegevoegd, wordt gedefinieerd als dag 0. Voor de

overlevingsexperimenten en de bepaling van de fertiliteit werd gewerkt met Petriplaatjes met een diameter van 5.5 cm. Omdat voor de bepaling van de volumes echter grotere hoeveelheden wormen nodig zijn, werd daar gebruik gemaakt van grotere platen (Ø 8.5 cm). Om de dikte van de laag bacteriën op de grote en kleine Petriplaten gelijk te houden, werd op de platen voor de volumebepalingen een hoger aantal bacteriën gebracht, rekening houdend met de oppervlakte van de plaat. Alle experimenten werden uitgevoerd bij 20°C.

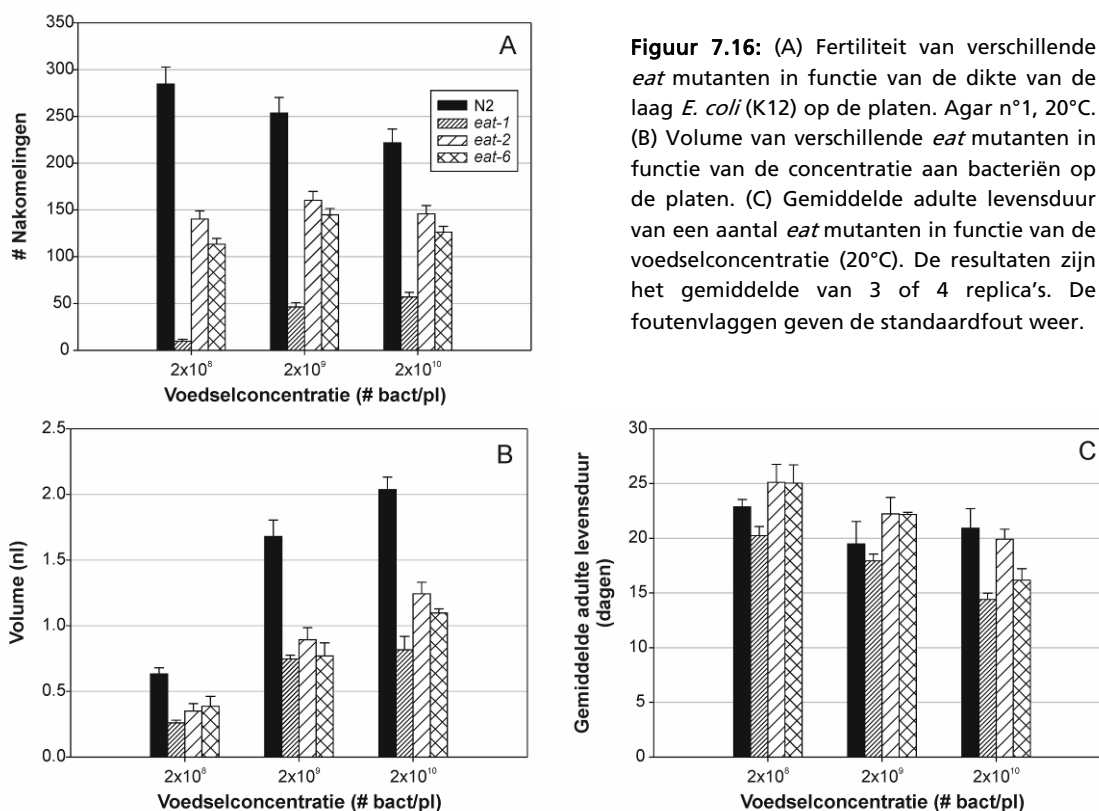
7.2.3 Resultaten en discussie

Indien *eat* mutanten inderdaad calorisch gerestricteerd zouden zijn, zouden deze mutanten langer moeten leven dan N2 bij een bacteriële concentratie die niet limiterend is voor de wild type stam. Om na te gaan bij welke voedselconcentratie het effect van een *eat* mutatie op de levensduur maximaal is, werden drie concentraties aan bacteriën uitgetest, namelijk 2×10^{10} , 2×10^9 en 2×10^8 bact/pl. Uit eerdere experimenten (zie 7.1.3.1.1) blijkt namelijk dat er in deze concentratie *range* geen effecten van de hoeveelheid voedsel zijn op de levensduur van N2. Een lagere concentratie veroorzaakt daarentegen een verlenging van de levensduur. In tegenstelling tot een concentratie van 2×10^{10} bact/pl, geeft een concentratie van 2×10^8 bact/pl aanleiding tot een zeer dun laagje cellen dat praktisch niet waarneembaar is met het blote oog.

7.2.3.1 Agarplaten zonder nutriënten met *E. coli* stam K12

In een eerste experiment werden L1 larven op agar n°1 platen (zonder nutriënten) gebracht met gewassen bacteriën. Aangezien in ons laboratorium gewoonlijk met de *E. coli* stam K12 gewerkt wordt, werd deze ook hier gebruikt. De invloed van de bacteriële concentratie op de fertiliteit, het volume en de levensduur van de mutanten werd onderzocht. De interpretatie van de resultaten wordt echter bemoeilijkt door het feit dat de controlestam N2 en de mutanten niet binnen éénzelfde experiment geanalyseerd werden. Een aantal (voorzichtige) conclusies is echter wel uit de resultaten af te leiden. Uit figuur 7.16A blijkt dat de fertiliteit van de verschillende *eat* mutanten weinig invloed ondervindt van de bacteriële concentratie. Er is een lichte stijging van het aantal nakomelingen van N2 in functie van een dalende voedselconcentratie ($p = 0.027$ voor 2×10^{10} t.o.v. 2×10^9 bact/pl en $p = 0.022$ voor 2×10^9 t.o.v. 2×10^8 bact/pl). Voor de *eat-2* mutant is er geen effect van de voedselconcentratie op de fertiliteit ($p = 0.25$). Bij de *eat-6* mutant is enkel het verschil tussen 2×10^8 en 2×10^9 bact/pl significant ($p = 0.002$). De *eat-1* mutant produceert, in tegenstelling tot N2, minder nakomelingen naarmate de concentratie aan bacteriën op de platen vermindert. Enkel het verschil tussen 2×10^{10} en 2×10^9 bact/pl is niet significant ($p = 0.22$, $p < 0.0001$ voor de overige vergelijkingen). Het zeer lage aantal nakomelingen van de *eat-1* mutant is onder andere een gevolg van het niet uitkomen van een groot gedeelte van de afgelegde eitjes. Wat vooral opvalt, is dat de mutanten een aanzienlijk lager aantal nakomelingen produceren dan N2. Hoewel het strict genomen niet helemaal correct is om deze vergelijking te maken, lijkt het verschil te groot om enkel te wijten te zijn aan

experimentele variatie. Bijgevolg kan geconcludeerd worden dat de *eat* mutanten systematisch minder nakomelingen produceren dan N2. In figuur 7.16B worden de wormvolumes in functie van de voedselconcentratie weergegeven. Zowel N2 als elk van de *eat* mutanten vertoont een daling van het volume als de concentratie aan bacteriën op de agarplaten verminderd wordt. Deze dalende trend is significant voor de vier stammen ($p < 0.0001$ voor N2, *eat-2* en *eat-6* en $p = 0.003$ voor *eat-1*, regressie-analyse). Ook hier valt op dat het volume van de *eat* mutanten aanzienlijk kleiner is dan dat van wild type wormen. In figuur 7.16C tenslotte, wordt de gemiddelde adulte levensduur van de verschillende stammen in functie van de bacteriële concentratie weergegeven. Hieruit blijkt dat er geen noemenswaardige verschillen in adulte levensduur zijn tussen N2 en de verschillende *eat* mutanten. Wel kan vastgesteld worden dat de gemiddelde levensduur van de *eat* mutanten stijgt naarmate de concentratie aan bacteriën op de platen daalt ($p < 0.0001$ voor *eat-1*, $p = 0.036$ voor *eat-2* en $p < 0.001$ voor *eat-6*, regressie-analyse). Deze trend wordt niet waargenomen bij wild type wormen ($p = 0.77$, regressie-analyse).



De resultaten van de fertiliteit en het volume liggen in de lijn der verwachtingen voor gerestricteerde wormen. Een gereduceerde fertiliteit wordt ook waargenomen bij wormen die door middel van voedselverdunding of axenische kweek onderworpen worden aan CR (Klass, 1977; Houthoofd *et al.*, 2002b; zie ook Hoofdstuk 7.1), en verschillende *C. elegans* mutanten met een defect in de opname van voedsel zijn kleiner dan wild type wormen (Mörck en Pilon, 2006). Ook in andere modelorganismen gaat CR gepaard met een verminderde fertiliteit (Chippindale *et al.*, 1993; Holehan en Merry, 1985) en een reductie van de lichaamsgrootte (Miller *et al.*, 2002; Tu en Tatar, 2003). De resultaten van de

overlevingsexperimenten zijn echter in strijd met wat verwacht wordt voor calorisch gerespecteerde dieren. Door de experimentele opzet zullen kleine verschillen in levensduur vermoedelijk niet detecteerbaar zijn. In het geval van *eat-2(ad1116)* werd eerder echter een levensduurverlenging van 57% gerapporteerd (Lakowski en Hekimi, 1998). Aangezien de wild type stam in dit experiment een volledig normale gemiddelde adulte levensduur van ongeveer 20 dagen heeft (net zoals in de Lakowski en Hekimi publicatie), werd bij de *eat-2* mutant toch minstens een klein effect op de levensduur verwacht. Dit wordt echter niet waargenomen. De *eat-1* mutant heeft bovendien eerder een lagere dan een hogere levensverwachting dan de wild type stam N2. De stijgende levensduur van de *eat* mutanten in functie van een dalende voedsel concentratie suggereert dat deze wormen toch calorische restrictie ondervinden. Dat deze trend niet zichtbaar is bij N2 zou kunnen betekenen dat wild type wormen en *eat* mutanten gerespecteerd zijn in een verschillende concentratie *range*.

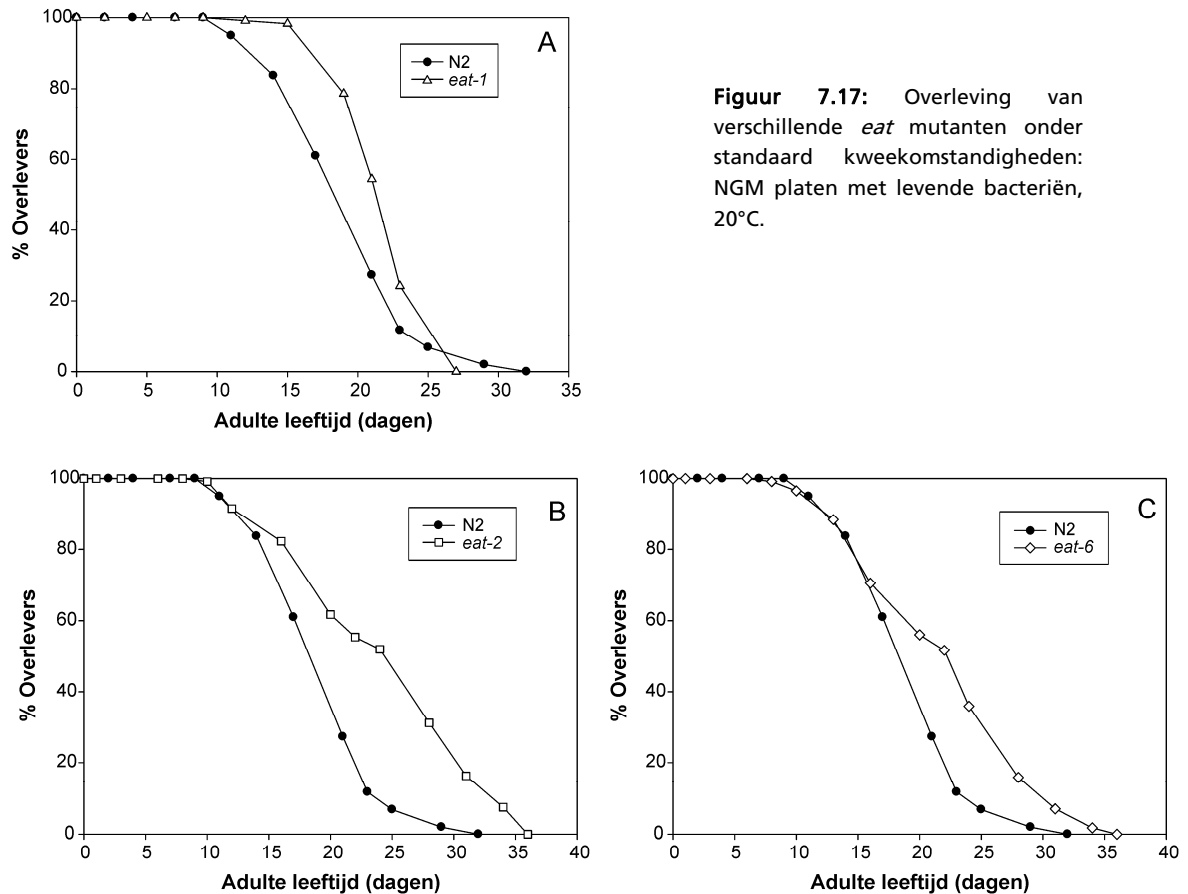
Omdat de standaard kweekmethode voor *C. elegans* bestaat uit het gebruik van NGM platen met de *E. coli* stam OP50, is het niet uit te sluiten dat de afwezigheid van een effect van een *eat* mutatie op de levensduur te wijten is aan de gebruikte kweekcondities.

7.2.3.2 NGM platen met OP50

Vervolgens werd nagegaan of de verschillende *eat* mutanten in onze handen al dan niet langer leefden dan N2 onder standaard kweekcondities. Wanneer de wormen gegroeid werden op NGM platen met levende (en dus delende) OP50 cellen, vertoonden de drie *eat* mutanten een vertraagde ontwikkeling ten opzichte van wild type wormen. N2 ontwikkelde tot jong-adulte wormen op ongeveer 2.5 dagen. *eat-1*, *eat-2* en *eat-6* deden daar respectievelijk ongeveer 3, 3.5 en 4 dagen over. In figuur 7.17 en tabel 7.10 worden de resultaten van het overlevingsexperiment weergegeven. Uit deze data blijkt dat elk van de *eat* mutanten langer leeft dan N2. De levensduurverlenging is het grootst voor *eat-2*, wat in overeenstemming is met de observaties van Lakowski en Hekimi (1998). Bemerkt echter dat de levensduurverlengingen in de huidige studie slechts ongeveer de helft bedragen van wat oorspronkelijk gepubliceerd werd.

Stam	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	<i>N</i>	<i>p</i> (log-rank)
N2	19.9 \pm 0.4	23 \pm 0.4	-	109	-
<i>eat-1(ad427)</i>	22.5 \pm 0.3	23 \pm 0.4	+ 13.1	115	< 0.0001
<i>eat-2(ad1116)</i>	24.9 \pm 0.7	31 \pm 0.8	+ 25.1	91	< 0.0001
<i>eat-6(ad467)</i>	22.7 \pm 0.8	28 \pm 0.9	+ 14.1	72	= 0.0001

Tabel 7.10: Overlevingskarakteristieken van N2, *eat-1(ad427)*, *eat-2(ad1116)* en *eat-6(ad467)* bij 20°C op NGM platen met OP50. De gemiddelde adulte levensduur is weergegeven in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur.



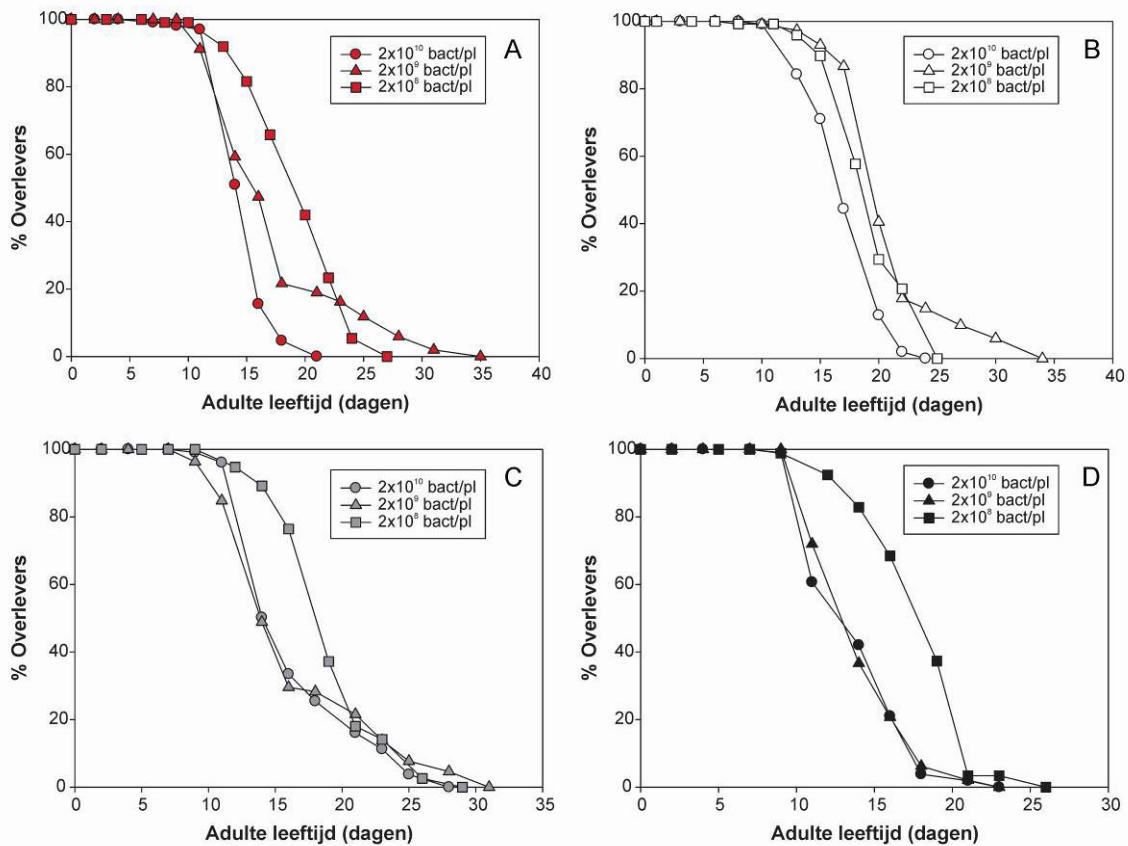
Deze resultaten zijn in tegenspraak met eerdere observaties in dit laboratorium (Houthoofd *et al.*, 2005c). Er dient echter opgemerkt te worden dat gebleken is dat de OP50 stock van ons laboratorium waarschijnlijk reeds geruime tijd gecontamineerd was, met alle mogelijke problemen van dien. Het is dus niet uitgesloten dat dit aan de basis ligt van de tegenstrijdige waarnemingen.

7.2.3.3 NGM platen met *E. coli* stam OP50 en carbenicilline

Tenslotte werd onderzocht of de verlengde levensduur van de *eat* mutanten onder deze standaard condities beïnvloed wordt door de dikte van de laag bacteriën. Wormen werden in het L1 stadium op NGM platen gebracht met verschillende concentraties aan carbenicilline-behandelde bacteriën (stam OP50). Carbenicilline interfereert met de synthese van de celwand, waardoor de bacteriën niet meer kunnen delen. Op 2×10^{10} en 2×10^9 bact/pl ontwikkelden N2 larven op 2 dagen tot jong-adulte wormen. Op 2×10^8 bact/pl nam de ontwikkeling ongeveer 3.5 dagen in beslag. *eat-2* ontwikkelde even snel als N2, behalve op de laagste bacteriële concentratie; daar bedroeg de ontwikkelingstijd 4 dagen. *eat-1* larven ontwikkelden tot jong-adulte wormen op ongeveer 3 dagen op de twee hoogste bacteriële concentraties en op 5.5 dagen op 2×10^8 bact/pl. Bij *eat-6* tenslotte, bedroeg de ontwikkelingstijd ongeveer 2.5 dagen, behalve op 2×10^8 bact/pl. Op deze concentratie

ontwikkelden *eat-6* larven op 4 dagen tot jong-adulte wormen. Enkel de laagste bacteriële concentratie (2×10^8 bact/pl) heeft dus een invloed op de ontwikkelingstijd van de wormen. Bovendien ontwikkelen de *eat* mutanten steeds trager dan N2 (met uitzondering van *eat-2* op de twee hoogste voedselconcentraties, waar er geen verschil was).

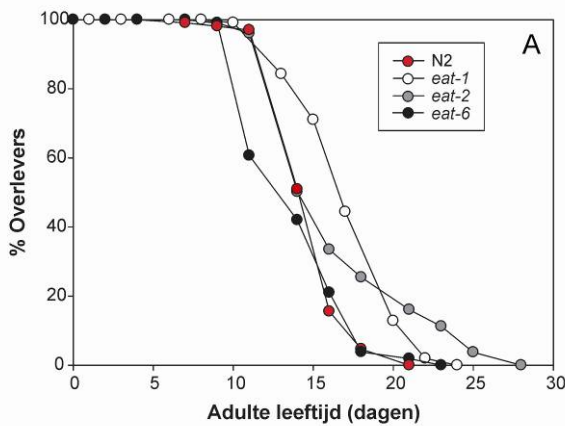
In figuur 7.18 wordt per stam het effect van de bacteriële concentratie op de levensduur getoond. Hieruit blijkt dat de adulte levensduur van de wormen lichtjes toeneemt in functie van een dalende voedselconcentratie. Over het algemeen leven wormen op 2×10^8 bact/pl langer dan wormen op 2×10^9 of 2×10^{10} bact/pl. De omvang van levensduurverlenging varieert tussen de verschillende stammen en bedraagt maximaal 30% wanneer de hoogste en de laagste concentraties met elkaar vergeleken worden.



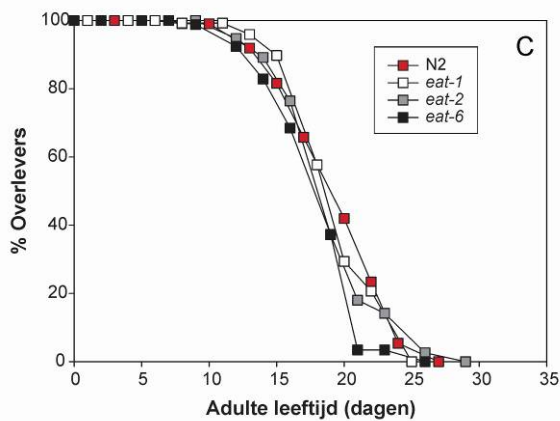
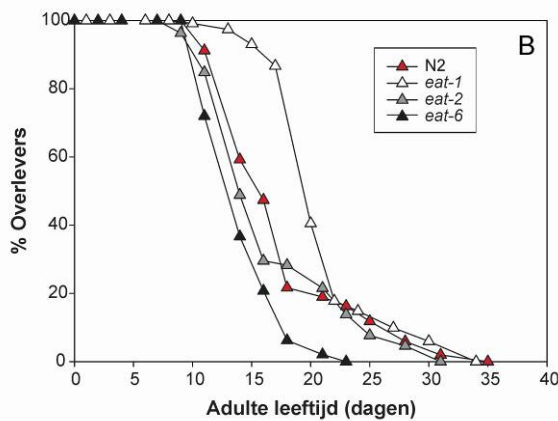
Figuur 7.18: Effect van *E. coli* OP50 concentratie op de levensduur van wild type wormen en een aantal *eat* mutanten (20°C). NGM platen met carbenicilline. (A) N2. (B) *eat-1(ad427)*. (C) *eat-2(ad1116)*. (D) *eat-6(ad467)*. Wormen op 2×10^8 bact/pl leven steeds langer dan wormen op 2×10^{10} bact/pl. Dit verschil is significant voor alle stammen ($p < 0.0001$).

Wanneer per bacteriële concentratie het effect van een *eat* mutatie op de levensduur nagegaan wordt (Fig. 7.19 en tabel 7.11), blijkt dat de verschillen in levensduur ten opzichte van de wild type stam N2 slechts zeer beperkt zijn. Op 2×10^{10} bact/pl leven enkel *eat-1* en *eat-2* langer dan wild type wormen en deze levensduurverlenging is veel kleiner dan eerder gepubliceerd werd (Lakowski en Hekimi, 1998). Op 2×10^9 bact/pl heeft enkel *eat-1* nog een verlengde levensduur in vergelijking met N2. Op 2×10^8 bact/pl tenslotte, leeft geen enkele

eat mutant meer langer dan wild type wormen. Opvallend is ook dat *eat-6* bij elke voedselconcentratie een lagere levensverwachting heeft dan N2. Enkel op 2×10^{10} bact/pl is dit verschil niet significant.



Figuur 7.19: Effect van *eat* mutatie op de levensduur (20°C). NGM platen met carbenicilline en verschillende *E. coli* OP50 concentraties. (A) 2×10^{10} bact/pl. (B) 2×10^9 bact/pl. (C) 2×10^8 bact/pl.



Wat meteen opvalt is dat de verlengde levensduur van de *eat* mutanten op NGM platen met levende OP50 (Fig. 7.17 en tabel 7.10) schijnbaar teniet gedaan wordt door het toevoegen van carbenicilline aan de voedingsbodems. Opvallend is ook dat onder deze laatste omstandigheden de gemiddelde levensduur van N2 op 2×10^{10} bact/pl aanzienlijk lager is dan gewoonlijk geobserveerd wordt; 15.3 i.p.v. 18 à 20 dagen. Dit experiment werd echter slechts één maal uitgevoerd. Waarschijnlijk is er geen sprake van een toxisch effect van het antibioticum carbenicilline op de levensduur van de wild type stam, aangezien de gemiddelde adulte levensduur op 2×10^9 en 2×10^8 bact/pl wel normaal is. In tegenstelling tot cellen die bv. bestraald worden, kunnen carbenicilline-behandelde bacteriën nog een beperkt aantal keren delen alvorens ze een groeistop ondergaan. Bijgevolg is de concentratie aan *E. coli* op de NGM platen hoger dan aangegeven, wat mogelijk aanleiding geeft tot overvoeding. Dit zou kunnen onderzocht worden door het experiment te herhalen op NGM platen met bestraalde OP50. Indien bacteriën behandeld worden met een dosis van minstens 5 kGy, kunnen ze nl. niet meer delen. Dit experiment werd uitgevoerd, maar de gebruikte OP50 stock was met grote waarschijnlijkheid gecontamineerd. N2 had op deze platen een gemiddelde adulte levensduur van ongeveer 25 dagen en leefde dus veel langer

dan op carbenicilline-behandelde bacteriën. Dit suggereert inderdaad een effect van overvoeding onder deze laatste condities.

Stam	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	<i>N</i>	<i>p</i> (log-rank)
<i>2x10¹⁰ bact/pl</i>					
N2	15.3 \pm 0.2	16 \pm 0.2	-	76	-
<i>eat-1</i>	17.7 \pm 0.3	20 \pm 0.3	+ 15.7	103	< 0.0001
<i>eat-2</i>	17.0 \pm 0.5	21 \pm 1.2	+ 11.1	81	= 0.011
<i>eat-6</i>	14.2 \pm 0.3	16 \pm 0.5	- 7.2	78	= 0.067
<i>2x10⁹ bact/pl</i>					
N2	17.8 \pm 0.6	18 \pm 0.8	-	76	-
<i>eat-1</i>	21.5 \pm 0.4	22 \pm 0.3	+ 20.8	105	< 0.0001
<i>eat-2</i>	17.0 \pm 0.6	21 \pm 1.2	- 4.5	78	= 0.193
<i>eat-6</i>	14.5 \pm 0.4	16 \pm 0.6	- 18.5	67	< 0.0001
<i>2x10⁸ bact/pl</i>					
N2	19.9 \pm 0.4	20 \pm 0.7	-	72	-
<i>eat-1</i>	19.9 \pm 0.3	20 \pm 0.3	+ 0	96	= 0.640
<i>eat-2</i>	19.6 \pm 0.4	19 \pm 0.4	- 1.5	94	= 0.462
<i>eat-6</i>	18.4 \pm 0.4	19 \pm 0.7	- 7.5	46	= 0.002

Tabel 7.11: Effect van *eat* mutatie op de gemiddelde adulte levensduur van wormen op NGM platen met carbenicilline en 2×10^{10} , 2×10^9 en 2×10^8 bact/pl. De temperatuur van het experiment bedroeg 20°C. De gemiddelde levensduur is weergegeven in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur.

7.2.4 Besluit

Er kon geen verband vastgesteld worden tussen de dikte van de laag *E. coli* op de agarplaten en de levensduur van drie verschillende *eat* mutanten. Bovenstaande resultaten tonen bovendien aan dat de levensduur van de *eat* mutanten sterk conditie-afhankelijk is. Enkel onder standaard kweekcondities (NGM + levende OP50, 20°C) werd een duidelijke verlenging van de levensduur geobserveerd ten opzicht van wild type wormen en dit zowel voor *eat-2(ad1116)*, als voor *eat-1(ad427)* en *eat-6(ad-467)*. Het toevoegen van het antibioticum carbenicilline aan de NGM platen onderdrukte grotendeels deze verlengde levensduur. Ook indien een alternatieve *E. coli* stam gebruikt werd, zoals de in ons laboratorium veel gebruikte stam K12, werd geen verlenging van de levensduur geobserveerd in vergelijking met N2. Bijgevolg kunnen *eat* mutanten slechts met de grootst mogelijke voorzichtigheid gebruikt worden voor onderzoek naar CR in *C. elegans*.

7.3 Vertraagde veroudering in calorisch gerestricteerde wormen

Gepubliceerd als:

Lenaerts, I., Van Eygen, S., Vanfleteren, J. (2007). Adult-limited dietary restriction slows Gompertzian aging in *Caenorhabditis elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, 442-448.

7.3.1 Inleiding

Recent onderzoek in fruitvliegen en knaagdieren maakte gebruik van de Gompertz-vergelijking (Gompertz, 1825) om het biodemografische mechanisme te bestuderen dat aan de basis ligt van de levensduurverlenging tengevolge van calorische restrictie (Mair *et al.*, 2003; Merry, 2005). Dit model beschrijft de exponentiële toename van de *mortality rate* in functie van de leeftijd als $m(t) = Ae^{Gt}$ (zie Hoofdstuk 1). Wanneer $m(t)$ in grafiek wordt uitgezet ten opzichte van de leeftijd op een semi-logaritmische schaal, bekomt men een rechte met intercept $\ln(A)$ en richtingscoëfficiënt G . Het intercept geeft de initiële *mortality rate* weer en is een indicatie van de intrinsieke kwetsbaarheid of het risico op sterven. G stelt de versnelling van de *mortality rate* in functie van de leeftijd voor en is een maat voor de snelheid van verouderen. In principe zou CR de levensduur kunnen beïnvloeden door de leeftijd waarbij een versnelling van de *mortality rate* voor het eerst gedetecteerd wordt uit te stellen (verandering in A), door de MRDT (*Mortality Rate Doubling Time*), die omgekeerd evenredig is met de Gompertz coëfficiënt G , te verhogen, of door een combinatie van beide (Finch, 1990). Het doel van dit onderzoek was (1) de biodemografische basis vaststellen van de levensduurverlenging tengevolge van CR in *C. elegans*, (2) het effect van de nutritionele status tijdens de ontwikkeling nagaan op de adulte levensduur en (3) het effect van de leeftijd bestuderen op de sterkte van de respons op CR.

7.3.2 Materiaal en methoden

De nematoden werden gegroeid op axenisch medium in agarplaten (Ø 5.5 cm) in aanwezigheid van een hoge (2×10^9 bact/pl) of een lage (1×10^7 bact/pl of 2×10^6 bact/pl) concentratie aan bestraalde bacteriën (stam K12, 10 kGy). De twee laagste concentraties aan bacteriën worden beschouwd als CR. Bij het naderen van het adulte stadium (dag 0), werden de wormen overgebracht naar platen met 50 μ M FudR. De levensduur werd bepaald door de overleving van een synchrone populatie hermafrodieten (N2, CGC *male stock*) (Gems en Riddle, 2000b) op regelmatige tijdstippen op te volgen. Er werden twee shift experimenten uitgevoerd waarbij wormen van goed gevoede naar CR condities werden overgebracht en omgekeerd. Deze shifts werden uitgevoerd op dag 0 of op dag 11. De experimenten werden uitgevoerd bij 20°C.

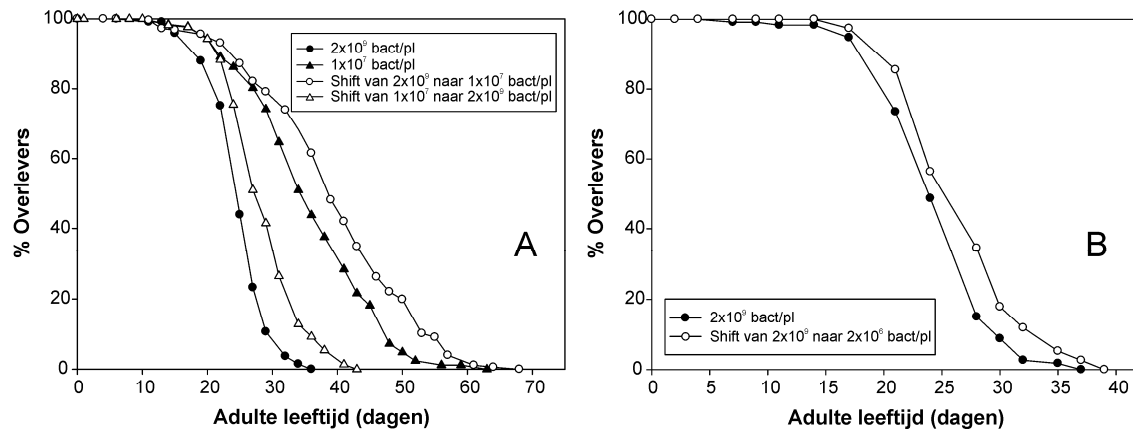
7.3.3 Resultaten

In een eerste experiment werden wormen onder goed gevoede of CR condities gegroeid vanaf het L1 stadium. Bij het naderen van het adulte stadium werd de helft van elke populatie overgebracht naar de alternatieve voedingscondities. De resultaten van de overleving zijn weergegeven in figuur 7.20A en tabel 7.12 (bovenste helft). Wormen die gedurende hun hele leven aan CR onderworpen werden, leefden ongeveer 42% langer dan de goed gevoede controles. Dieren die van hoge naar lage voedselconcentratie overgebracht werden, leefden significant langer dan de CR controles. Omgekeerd leefden dieren die van CR naar goed gevoede condities getransfereerd werden korter dan CR wormen, maar toch nog significant langer dan de goed gevoede controles. Dus, hoewel de effecten van CR in *C. elegans* voornamelijk tot uiting komen tijdens het volwassen stadium, heeft CR tijdens de ontwikkeling toch een kleine voordelige invloed op de levensduur. Een tweede replica (Tabel 7.12, onderste helft) leidde tot dezelfde conclusies.

In een tweede experiment werden 11-dagen-oude, goed gevoede wormen overgebracht naar CR condities. Dit resulteerde in een kleine (7.1%), maar significante verlenging van de levensduur (Fig. 7.20B en Tabel 7.13). Dus, hoewel de wormen nog steeds kunnen reageren op de initiatie van CR, zwakt de sterkte van de respons af tijdens veroudering, wat in overeenstemming is met eerdere resultaten (Klass, 1977; Lee *et al.*, 2006).

Bacteriële concentratie	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	N	P (log-rank)
<i>Replica 1</i>					
2x10 ⁹ bact/pl	25.5 \pm 0.3	27	-	287	-
1x10 ⁷ bact/pl	36.2 \pm 0.9	43	41.9	113	< 0.0001
Shift 2x10 ⁹ \rightarrow 1x10 ⁷ bact/pl	39.7 \pm 0.8	46	55.7	207	< 0.0001
Shift 1x10 ⁷ \rightarrow 2x10 ⁹ bact/pl	29.1 \pm 0.5	34	14.1	141	< 0.0001
1x10 ⁷ bact/pl	36.2 \pm 0.9	43	-	113	-
Shift 2x10 ⁹ \rightarrow 1x10 ⁷ bact/pl	39.7 \pm 0.8	46	9.7	207	< 0.0001
<i>Replica 2</i>					
2x10 ⁹ bact/pl	25.1 \pm 0.4	28	-	66	-
1x10 ⁷ bact/pl	33.9 \pm 0.9	38	35.1	105	< 0.0001
Shift 2x10 ⁹ \rightarrow 1x10 ⁷ bact/pl	37.1 \pm 1.9	47	47.8	63	< 0.0001
Shift 1x10 ⁷ \rightarrow 2x10 ⁹ bact/pl	27.2 \pm 0.4	31	8.4	124	< 0.0001
1x10 ⁷ bact/pl	33.9 \pm 0.9	38	-	153	-
Shift 2x10 ⁹ \rightarrow 1x10 ⁷ bact/pl	37.1 \pm 1.9	47	9.4	164	0.119

Tabel 7.12: Overzicht van de overlevingsgegevens bij 20°C voor experiment 1 (shift op dag 0). De gemiddelde adulte levensduur is uitgedrukt in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur.



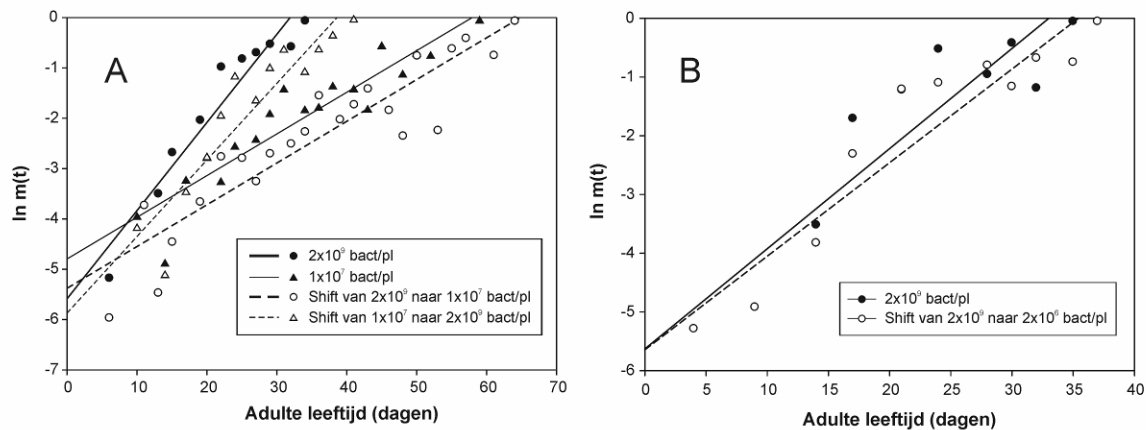
Figuur 7.20: Overleving van wild type wormen op agarplaten met axenisch medium, in aanwezigheid van een hoge of een lage concentratie bestraalde bacteriën (*E. coli* K12, 10 kGy). De experimenten werden uitgevoerd bij 20°C. (A) Shift op dag 0. (B) Shift op dag 11. In dit experiment werd een lagere *E. coli* concentratie gebruikt als CR conditie, in de hoop een maximale verlenging van de levensduur te bekomen. Onder deze omstandigheden bleek de shift van CR naar goed gevoede condities echter niet mogelijk, omdat onvoldoende wormen adult werden. Daarom werd in de overige experimenten gebruik gemaakt van een iets hogere concentratie aan bacteriën (1×10^7 bact/pl).

Bacteriële concentratie	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	<i>N</i>	<i>P</i> (log-rank)
2×10^9 bact/pl	25.5 ± 0.4	28	-	109	-
Shift $2 \times 10^9 \rightarrow 2 \times 10^6$ bact/pl	27.3 ± 0.4	30	7.1	151	0.002

Tabel 7.13: Overzicht van de overlevingsgegevens bij 20°C van experiment 2 (shift op dag 11). De gemiddelde adulte levensduur is uitgedrukt in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur. In dit experiment werd een lagere *E. coli* concentratie gebruikt als CR conditie, in de hoop een maximale verlenging van de levensduur te bekomen. Onder deze omstandigheden bleek de shift van CR naar goed gevoede condities echter niet mogelijk, omdat onvoldoende wormen adult werden. Daarom werd in de overige experimenten gebruik gemaakt van een iets hogere concentratie aan bacteriën (1×10^7 bact/pl).

De leeftijd-specifieke *mortality rate* werd vervolgens afgeleid uit de overlevingscurven en de Gompertz-vergelijking werd gebruikt voor de berekening van de mortaliteitsparameters. Een vergelijking tussen de goed gevoede en CR controles (Fig. 7.21A en Tabel 7.14, bovenste helft) geeft duidelijk aan dat de leeftijd-specifieke sterfte daalt tengevolge van CR door een daling van de richtingscoëfficiënt *G* en een verdubbeling van de MRDT van 3.9 naar 8.7 dagen. Als goed gevoede wormen op dag 0 naar een lagere concentratie aan bacteriën getransfereerd werden, was de MRDT niet te onderscheiden van die van de CR controles. De omgekeerde shift leidde tot een MRDT die deze van de goed gevoede controles benaderde. Deze resultaten tonen aan dat de levensduurverlenging tengevolge van CR in *C. elegans* veroorzaakt wordt door een echte vertraging van het verouderingsproces, waarschijnlijk tengevolge van een vertraagde accumulatie van moleculaire schade. Een tweede replica van dit experiment leidde tot dezelfde conclusies. Als wormen van hoge naar lage voedselconcentratie getransfereerd werden op dag 11 (Fig. 7.21B en Tabel 7.14, onderste helft), resulteerde dit niet in een verandering van de MRDT. Dus, de biodemografische respons op een veranderde voeding is verzwakt in 11-dagen-oude dieren in vergelijking met

jonge dieren. Dit zou kunnen wijzen op een daling van de capaciteit om te reageren op CR met toenemende leeftijd.



Figuur 7.21: \ln van de leeftijd-specifieke *mortality rate* in functie van de adulte levensduur. (A) Shift op dag 0. (B) Shift op dag 11.

Bacteriële concentratie	$\ln(A) \pm SE$	$G \pm SE$	MRDT (dagen)
Shift op dag 0			
<i>Replica 1</i>			
2×10^9 bact/pl	-5.6 ± 0.38	0.18 ± 0.02	3.9
1×10^7 bact/pl	-4.8 ± 0.28	0.08 ± 0.007	8.7
Shift $2 \times 10^9 \rightarrow 1 \times 10^7$ bact/pl	-5.4 ± 0.31	0.08 ± 0.008	8.7
Shift $1 \times 10^7 \rightarrow 2 \times 10^9$ bact/pl	-5.9 ± 0.53	0.15 ± 0.02	4.6
<i>Replica 2</i>			
2×10^9 bact/pl	-5.5 ± 0.43	0.16 ± 0.02	4.3
1×10^7 bact/pl	-3.7 ± 0.23	0.05 ± 0.006	13.8
Shift $2 \times 10^9 \rightarrow 1 \times 10^7$ bact/pl	-3.8 ± 0.19	0.04 ± 0.004	17.3
Shift $1 \times 10^7 \rightarrow 2 \times 10^9$ bact/pl	-4.5 ± 0.31	0.12 ± 0.013	5.8
Shift op dag 11			
2×10^9 bact/pl	-5.6 ± 0.37	0.17 ± 0.02	4.1
Shift $2 \times 10^9 \rightarrow 2 \times 10^6$ bact/pl	-5.6 ± 0.30	0.16 ± 0.01	4.3

Tabel 7.14: Overzicht van de Gompertz-parameters. De MRDT wordt berekend als $\ln(2)/G$.

7.3.4 Discussie

Het gebruik van het Gompertz-model voor de berekening van de mortaliteitsparameters werd eerder in vraag gesteld omdat het veronderstelt dat de *mortality rate* constant toeneemt in functie van de leeftijd. Er werd echter in een toenemend aantal organismen, waaronder *C. elegans*, aangetoond dat dit niet het geval is. Integendeel, de *mortality rate* vertraagt op hoge leeftijd en in sommige organismen wordt zelfs een daling in functie van

de leeftijd waargenomen (Carey *et al.*, 1992; Curtsinger *et al.*, 1992; Brooks *et al.*, 1994; Vaupel *et al.*, 1998). Omdat eerder onderzoek uitwees dat het Weibull model geschikter zou zijn dan het Gompertz-model voor de fitting van overlevingsdata in *C. elegans* (Vanfleteren *et al.*, 1998), werden beide modellen met elkaar vergeleken op basis van de huidige dataset (niet getoond). Indien de fitting gebeurde op de *mortality rate*, was er geen onderscheid tussen beide modellen. Het Weibull model gaf echter een meer accurate schatting van de parameters indien het rechtstreeks op de overlevingscurve gefit werd. In dat geval kwam dit model ook als best passend naar voor, maar het verschil tussen beide modellen was zeer klein. Echter, zoals anderen reeds argumenteerden (de Magalhães *et al.*, 2005), ons doel was niet het vinden van het best passende model, maar wel nagaan of de exponentiële toename van de sterfte beïnvloed wordt door CR. Bovendien zijn de onderzochte populaties eerder klein, wat het vinden van een goed passend model bemoeilijkt. Het gebruik van de Gompertz-vergelijking is dan ook de beste keuze, aangezien het eenvoudig toepasbaar, maar tegelijk ook accuraat is (Wilson, 1993; de Magalhães *et al.*, 2005).

Bovenstaande resultaten zijn in tegenstelling met recente bevindingen die aantonen dat CR de adulte sterfte in *Drosophila melanogaster* verlaagt enkel en alleen door het reduceren van het onmiddellijke risico op sterven (Mair *et al.*, 2003; Magwere *et al.*, 2004). Nog recenter echter, onderzochten Bross en collega's (2005) een uitgebreider scala aan diëten in dit organisme en zij vonden een groter effect op de gemiddelde en maximale levensduur wanneer de goed gevoede voedingscondities twee maal zo hoog waren als het standaard *Drosophila* dieet. Over een breder spektrum aan nutritionele regimes verlaagde CR de adulte sterfte door een vertraging van de verouderingssnelheid (verandering van G). Deze bevindingen illustreren het belang van geschikte *ad libitum* condities, aangezien het standaard dieet dat in veel *Drosophila* laboratoria gebruikt wordt blijkbaar een energetische waarde heeft die reeds lijkt op CR (Bross *et al.*, 2005). In tegenstelling tot het effect van CR in *C. elegans*, neemt de respons op de overschakeling van goed gevoede naar CR condities in *Drosophila* niet af met toenemende leeftijd (Mair *et al.*, 2003).

Experimenten met zoogdiermodellen leveren extra bewijs voor de species-specificiteit van het werkingsmechanisme van CR. In ratten verhoogt CR de MRDT in de meeste studies wanneer het tijdens het jong-adulte stadium of eerder geïnitieerd wordt (Holehan en Merry, 1986; Pletcher *et al.*, 2000). Indien CR later gestart wordt, is er geen effect meer waarneembaar (Lipman *et al.*, 1998). In muizen beïnvloedt CR de risico-parameter (A) (MRDT blijft constant) (Weindruch en Walford, 1982; Pugh *et al.*, 1999b; Dhabbi *et al.*, 2004), hoewel het gevolg van CR gestart op latere leeftijd alsnog onduidelijk is.

Deze resultaten tonen aan dat de effecten van CR zich in ratten en nematoden voornamelijk manifesteren tijdens de vroege fasen van het adulte stadium (en in lichte mate tijdens de ontwikkeling). In vliegen echter, en in mindere mate in muizen, blijft de mogelijkheid om te reageren op CR volledig behouden tijdens het volwassen stadium. Een eenvoudige verklaring voor deze waarneming in *C. elegans* is dat verouderende wormen steeds minder eten, waardoor de dieren niet meer in staat zijn te reageren op een veranderde nutritionele conditie. Het is echter onduidelijk hoe dit de respons van de andere modelorganismen zou kunnen verklaren. Zeer recent werd door Masoro (2006) de hypothese naar voor geschoven dat CR de levensduur zou kunnen verlengen door zowel de vorming van schadelijke producten te reduceren en, omdat het een lage-intensiteitsstressor

is, door aanleiding te geven tot hormesis en defensiemechanismen tegen stress te induceren die ook beschermen tegen veroudering. Volgens deze visie verliezen veel, maar niet alle, *ad libitum* gevoede dieren gaandeweg de mogelijkheid om te reageren op CR door hormesis en wanneer dit verlies een zekere drempel overschrijdt, zal de initiatie van CR niet langer leiden tot een verlenging van de levensduur. Hoewel dit een interessante verklaring is die een uitdagend uitgangspunt vormt voor verder onderzoek, blijft het vooralsnog onduidelijk waarom bepaalde organismen hun hormesis respons zouden verliezen en andere niet. Er kan dus geconcludeerd worden dat, hoewel de verlenging van de levensduur door CR wijdverspreid is in het dierenrijk, de onderliggende biologische mechanismen grotendeels species-specifiek blijken te zijn.

7.4 Levensduurverlenging in totale afwezigheid van voedsel

7.4.1 Inleiding

Zeer recent toonden twee onderzoeksgroepen gelijktijdig aan dat de volledige onthouding van voedsel (*E. coli*) tijdens het adulte stadium van *C. elegans* een verlengde levensduur tot gevolg heeft (Kaeberlein *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Deze resultaten zijn in strijd met andere rapporten waarin de bacteriële voedselbron verdund werd in buffer. In deze vloeibare culturen bereikt de levensduur een maximum bij een intermediaire voedselconcentratie. Een verdere reductie van de *E. coli* concentratie veroorzaakt een verkorting van de levensduur tengevolge van verhongering (Henderson en Johnson, 2001; Houthoofd *et al.*, 2003a; Panowski *et al.*, 2007). Een mogelijke verklaring voor deze contradictorische resultaten ligt in de gebruikte voedingscondities. In de Kaeberlein en Lee laboratoria werden de wormen gegroeid op NGM platen met ampicilline- (Lee *et al.*, 2006) of UV-behandelde (Kaeberlein *et al.*, 2006) bacteriën. Op het moment dat de dieren het adulte stadium bereikten, werden ze overgebracht naar NGM platen zonder bacteriën. In de andere studies werd gebruik gemaakt van buffer met een zeer lage concentratie aan bacteriën. NGM platen bevatten echter nog 0.25% pepton, wat een bron van aminozuren is. Het lijkt daarom niet onwaarschijnlijk dat de wormen nog voldoende nutriënten uit deze voedingsbodems kunnen halen om in hun minimale behoeften te voorzien. Bijgevolg zou de term CR beter van toepassing zijn dan verhongering. Deze mogelijkheid werd getest door wormen te groeien op NGM platen met en zonder bacteriën en op NGM platen zonder bacteriën en zonder pepton.

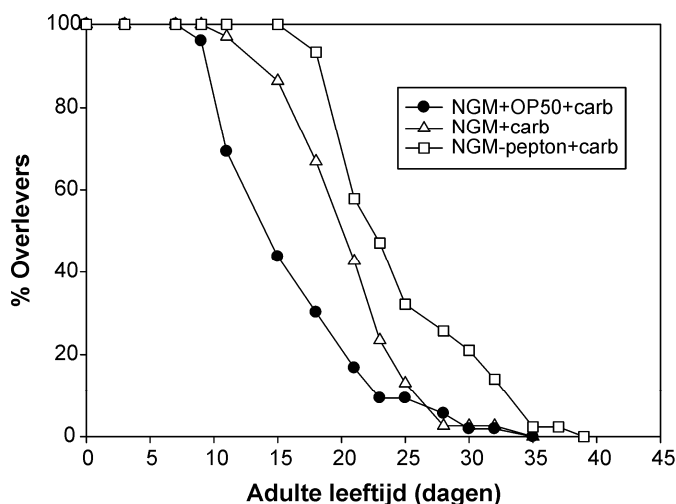
7.4.2 Materiaal en methoden

De wild type stam N2 werd vanaf het L1 stadium gegroeid op NGM platen met een laagje carbenicilline-behandelde bacteriën (OP50, 2×10^9 bact/pl). Op het moment dat de wormen het adulte stadium naderden, werden ze van de platen gespoeld, gewassen met S-buffer en overgepikt naar platen met 50 μ M FudR (= dag 0). Tegelijk werden ze onderworpen aan verschillende voedingscondities. Een eerste reeks wormen werd overgezet op NGM platen

met 2×10^9 carbenicilline-behandelde OP50. Dit zijn goed gevoede dieren. Een tweede reeks jong-adulten werd overgebracht naar NGM platen zonder *E. coli*. Dit zijn gerespecteerde condities. Een derde en laatste reeks wormen werd onderworpen aan verhogering door ze over te pikken op NGM platen zonder pepton en zonder bacteriën. Aan alle platen werd carbenicilline toegevoegd om de groei van residuele bacteriën te verhinderen. Het experiment werd uitgevoerd bij 20°C.

7.4.3 Resultaten

Op basis van de resultaten van Kaeberlein en Lee (Kaeberlein *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006), werd een verlenging van de levensduur verwacht op NGM platen met pepton, maar zonder bacteriën. Een verkorting van de levensduur op NGM platen zonder pepton en zonder bacteriën zou de hypothese dat NGM platen zonder bacteriën (maar met pepton) geen verhogering, maar wel CR veroorzaken, bevestigen. De resultaten van het overlevingsexperiment zijn getoond in figuur 7.22 en tabel 7.15.



Figuur 7.22: Overleving van wild type wormen bij 20°C op NGM platen met een laagje *E. coli* OP50 (2×10^9 bact/pl) (= goed gevoed), op NGM platen zonder *E. coli* (= CR) en op NGM platen zonder *E. coli* en zonder pepton (= veronderstelde verhogering).

Tegen de verwachtingen in, blijkt dat wormen op NGM platen zonder pepton en zonder bacteriën langer leven dan goed gevoede dieren. Meer zelfs, de langst levende wormen in dit experiment zijn net deze die geen voedingsstoffen meer tot hun beschikking hebben. Indien *C. elegans* gegroeid werd op NGM platen zonder bacteriën (maar met pepton), verlengde de levensduur met ongeveer 26% in vergelijking met goed gevoede dieren. De afwezigheid van pepton in de voedingsbodems veroorzaakte nog eens een bijkomende levensduurverlenging van ongeveer 18%. In vergelijking met goed gevoede dieren is dit een verlenging van de levensduur met bijna 50%. Deze resultaten tonen aan dat wormen op agarplaten in de totale afwezigheid van voedsel inderdaad langer leven dan goed gevoede dieren.

Conditie	Gemiddelde levensduur \pm SE	Leeftijd van laatste 25%	% Verschil	N	p (log-rank)
NGM+OP50	17.0 \pm 0.7	21 \pm 1.0	-	70	-
NGM	21.4 \pm 0.6	23 \pm 0.8	+ 25.9	52	< 0.0001
NGM-pepton	25.3 \pm 0.8	30 \pm 2.3	+ 48.8	49	< 0.0001
NGM	21.4 \pm 0.6	23 \pm 0.8	-	52	-
NGM-pepton	25.3 \pm 0.8	30 \pm 2.3	+ 18.2	49	< 0.0001

Tabel 7.15: Overlevingskarakteristieken van wild type wormen die gegroeid werden op NGM platen met een laagje OP50 (2×10^9 bact/pl), op NGM platen zonder bacteriën of op NGM platen zonder pepton en in afwezigheid van bacteriën. Aan alle platen werd carbenicilline toegevoegd. Het experiment werd uitgevoerd bij 20°C. De gemiddelde adulte levensduur is weergegeven in aantal dagen. Het percentage verschil verwijst naar het verschil in gemiddelde levensduur.

7.4.4 Discussie

Recent werd aangetoond dat wormen die gegroeid worden op NGM platen zonder bacteriën langer leven dan goed gevoede dieren (Kaeberlein *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Bovendien hebben deze wormen een toegenomen thermotolerantie en een verhoogde resistentie tegen paraquat-geïnduceerde oxidatieve stress. Dit fenotype bleek onafhankelijk van de transcriptiefactor DAF-16 (Kaeberlein *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Dit is in strijd met eerdere rapporten die niet alleen een verkorting van de levensduur vaststelden, maar die ook de betrokkenheid van DAF-16 beschrijven bij de respons op verhogering in *C. elegans*. Zo werd bijvoorbeeld aangetoond dat verschillende stresscondities, zoals o.a. de afwezigheid van voedsel, de snelle verhuis van een DAF-16:GFP reporter van het cytoplasma naar de nucleus tot gevolg had (Henderson en Johnson, 2001; Houthoofd *et al.*, 2003a; Weinkove *et al.*, 2006). Verhogering leidde ook tot de verhoogde expressie van een SOD-3::GFP transgen en deze inductie was DAF-16-afhankelijk (Henderson *et al.*, 2006). Ook Weinkove en collega's (2006) stelden vast dat DAF-16 een rol speelt in de bescherming tegen oxidatieve stress in de afwezigheid van voedsel. Waarschijnlijk zijn deze tegenstrijdige resultaten een gevolg van de gebruikte voedingscondities. Zo werden in de Kaeberlein en Lee studies NGM platen zonder bacteriën gebruikt, terwijl in de andere studies buffer met een zeer lage *E. coli* concentratie gebruikt werd.

In deze studie werd nagegaan of de aanwezigheid van pepton in de NGM platen zonder bacteriën aan de basis ligt van deze tegenstrijdige resultaten. Dit zou betekenen dat de groei van adulte wormen op NGM platen zonder bacteriën geen protocol is voor verhogering, maar een alternatieve methode om *C. elegans* te onderwerpen aan CR. Dit zou in overeenstemming zijn met rapporten die aantonen dat CR en DAF-16 de levensduur onafhankelijk van elkaar reguleren (Lakowski en Hekimi, 1998; Houthoofd *et al.*, 2003a). Ook de observatie dat een mutatie in *eat-2* geen verdere verlenging van de levensduur veroorzaakte in niet-gevoede wormen is in overeenstemming hiermee (Kaeberlein *et al.*, 2006). Tegen de verwachtingen in blijkt echter dat wormen die gegroeid werden op NGM platen zonder bacteriën en zonder pepton niet kortlevend zijn. In tegendeel, deze wormen

leefden bijna 50% langer dan goed gevoede dieren. De beperkte residuele beschikbaarheid aan nutriënten (pepton) blijkt dus niet de oorzaak te zijn van de tegenstrijdige observaties. Dus, zowel in vloeibare monoxenische cultuur als op vaste voedingsbodems veroorzaakt een milde reductie van de bacteriële concentratie (= CR condities) geen activering van de DAF-2/insuline *pathway* en de levensduurverlenging is onafhankelijk van DAF-2 signalisatie. De totale afwezigheid van voedsel in buffer veroorzaakt echter een stressrespons die verschillend is van CR en die de activering van de DAF-2/insuline *pathway* tot gevolg heeft. Dit leidt op zijn beurt tot de defosforylering van DAF-16 en zijn translocatie van het cytoplasma naar de nucleus, waar een beschermingsprogramma geactiveerd wordt (Houthoofd *et al.*, 2003a). Deze overgang tussen DAF-16-onafhankelijke CR condities en DAF-16-afhankelijke verhogering wordt dus niet waargenomen op agarplaten. Dit impliceert dat de relevante verschillen tussen de afwezigheid van voedsel op plaat of in vloeibare cultuur kunnen gereduceerd worden tot de eventuele voedingswaarde van de agar en de beschikbaarheid van zuurstof. Agar is een suikerpolymeer van galactose en *C. elegans* bezit verschillende enzymen nodig voor het metabolisme van dit suiker (Kegg databank, <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>). Mogelijk kunnen de wormen dus nog voedingsstoffen bekomen uit de agar. Een alternatieve mogelijkheid is dat vloeibare cultuur minder gunstig is voor de wormen, waardoor ze deze kweekomstandigheden als stresserend ervaren en er niet in slagen een beschermingsprogramma te activeren onder omstandigheden van strenge voedselrestrictie.

7.5 Onderzoek naar verouderings-geassocieerde metabole en fysiologische veranderingen in jonge *C. elegans* culturen

7.5.1 Inleiding

In de vorige paragrafen werd uitvoerig gebruik gemaakt van overlevingscurven om het effect van calorische restrictie op de levensduur van wormpopulaties te onderzoeken. Bij de analyse van een overlevingscurve gaat de aandacht vooral uit naar de lengte van de plateaufase (waar 100% van de populatie nog in leven is) en de vorm van de curve. Hoewel de focus hierbij ligt op het aantal sterfgevallen in functie van de leeftijd, kan men zich de vraag stellen of kenmerken van veroudering niet eerder tot uiting komen. Veroudering gaat in *C. elegans* gepaard met een aantal metabole en fysiologische veranderingen (zie Hoofdstuk 4.2). In dit onderzoek werd nagegaan of enkele van deze veranderingen zich reeds manifesteren in jonge wormpopulaties met een overlevingsgraad van minstens 80%.

De mitochondriën spelen een zeer belangrijke biochemische rol in een cel. Zij staan niet alleen in voor respiratie en oxidatieve fosforylatie, maar zijn ook de plaats waar o.a. de Krebscyclus en de vetzuuroxidatie doorgaan. In tal van organismen gaat veroudering gepaard met een toename van oxidatieve schade aan mitochondriale eiwitten en DNA, terwijl de mogelijkheid tot oxidatieve fosforylatie afneemt in functie van de leeftijd (Shigenaga *et al.*, 1994; Tsang en Lemire, 2003). Omdat de mitochondriën het energiecentrum vormen van een organisme, werden 3 parameters gemeten die een

indicatie kunnen geven van de metabole toestand van deze organellen. Deze zijn de lichtproductiepotentiaal (LPP), die een maat is voor de capaciteit van de elektronentransportketen, de ATP-concentratie, die een maat is voor de mogelijkheid om oxidatieve fosforylatie uit te voeren, en de aconitase activiteit, die een maat is voor de werking van de Krebscyclus. Deze processen zijn sterk met elkaar gekoppeld. Enerzijds zijn de intermediären van de Krebscyclus (NADH, FADH₂ en succinaat) noodzakelijk voor het voeden van de elektronentransportketen. Anderzijds is oxidatieve fosforylatie niet mogelijk zonder dit transport van elektronen, omdat het de opbouw van de noodzakelijke elektrochemische gradiënt tot gevolg heeft. Ook de accumulatie van beschadigde moleculen, onder de vorm van lipofuscines en geoxideerde flavinen, werd onderzocht in functie van de leeftijd.

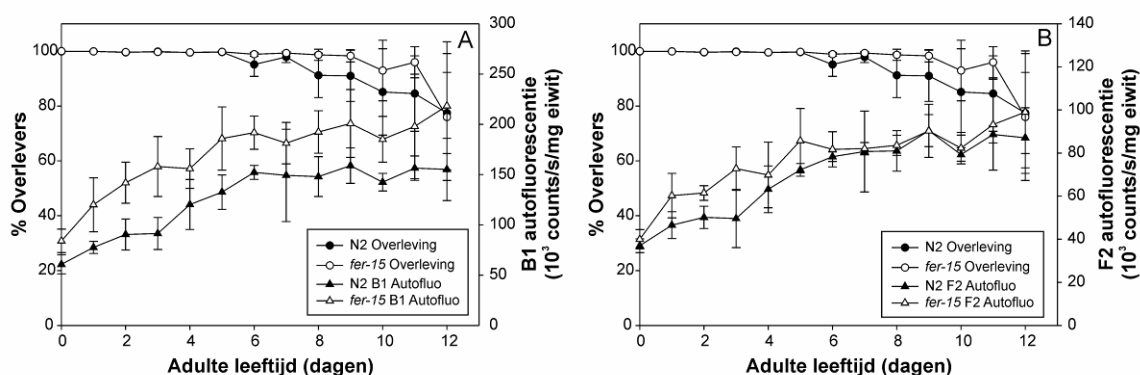
7.5.2 Materiaal en methoden

Omdat de contaminatie van een adulte populatie met juvenielen kan leiden tot een foute interpretatie van resultaten, is het belangrijk om te werken met synchrone cohorten. Hoewel FUDR kan beschouwd worden als een zeer competente inhibitor van DNA synthese, resulteert het relatief nauwe tijdsvenster waarin het moet toegevoegd worden soms toch in de productie van nakomelingen. Er werd getracht dit probleem zo veel mogelijk preventief op te vangen, door naast de wild type stam N2, ook de *fer-15(b26ts)* mutant in het experiment te betrekken. *fer-15(b26ts)* mutanten zijn steriel bij de restrictieve temperatuur van 25°C door een defect in de activering van spermatiden tot spermatozoïden.

Dubbel gechloroxte wormen werden na uitsluipen uit het ei in 200 ml axenisch medium gebracht in Fernbachflessen. Er werd gekozen voor vloeibare culturen omdat op die manier gemakkelijk grote populaties kunnen gekweekt worden. Het gebruik van axenische cultuur geeft bovendien aanleiding tot een plateaufase die beduidend langer is dan bij monoxenische culturen. Aan het medium werd een supplement toegevoegd van 4 ml geautoclaveerde (5 min) en bestraalde (10 kGy) *E. coli* (stam K12) (finale concentratie van 2×10^9 cellen/ml), om de snelle en synchrone ontwikkeling van de larven te bevorderen. De wormen werden opgegroeid bij 24°C. Op het moment dat ze het adulte stadium naderden, werd het medium vervangen door vers axenisch medium zonder bacteriën. 50 µM FUDR werd toegevoegd om de productie van nakomelingen te vermijden. Om het risico op contaminatie te beperken, werd elke cultuur verdeeld in 10 subculturen van 20 ml. Hiervoor werden weefselkweekflessen gebruikt van 75 cm². Voor de dagelijkse staalnames werd telkens 10 ml cultuur gebruikt. Het aantal levende en dode wormen werd geregistreerd. Vervolgens werden de wormen gewassen met S-buffer en geconcentreerd tot ± 1500 wormen/100 µl. 100 of 200 µl stalen werden overgebracht naar 2 ml buisjes en bewaard bij -75°C tot gebruik. De staalnames werden beperkt tot de periode waarin minstens 80% van de populatie nog in leven was. De resultaten zijn het gemiddelde van drie onafhankelijke tijdsreeksen.

7.5.3 Resultaten

Lipofuscine of verouderingspigment bestaat uit *crosslinks* van oxidatief gemodificeerde eiwitten en lipiden, en bevat ook carbohydraten en sporen van metalen. Postmitotische cellen accumuleren aanzienlijke hoeveelheden lipofuscines in de lysosomen, die op het einde van de levensduur grote aggregaten kunnen vormen. Omdat deze aggregaten metabool inert zijn, en dus niet kunnen verwijderd worden, hebben ze een progressieve achteruitgang van de cellulaire functies tot gevolg (Terman en Brunk, 2004). Flavoproteïnen maken gebruik van FMNH₂ of FADH₂ als cofactor voor redox reacties. Zo maakt FMNH₂ bv. deel uit van complex I van de elektronentransportketen, terwijl FADH₂ een cofactor is voor o.a. complex II (Voet en Voet, 1995). In figuur 7.23 wordt de B1 en F2 autofluorescentie in functie van de leeftijd weergegeven. Beide parameters vertonen eenzelfde verloop in N2 en *fer-15* ($p = 0,81$ voor de interactie tussen leeftijd en stam voor de B1 autofluorescentie en $p = 0,55$ voor de F2 autofluorescentie). Zowel de B1 als de F2 autofluorescentie nemen in beide stammen toe met stijgende leeftijd ($p = 0,0009$ voor B1 en $p = 0,0003$ voor F2). In de *fer-15* mutant is er wel een hogere opstapeling van lipofuscines dan in N2 ($p = 0,01$ voor het effect van de stam). Hoewel *fer-15* mutanten ook iets meer geoxideerde flavines schijnen te accumuleren, is dit verschil net niet significant ($p = 0,056$ voor het effect van de stam).

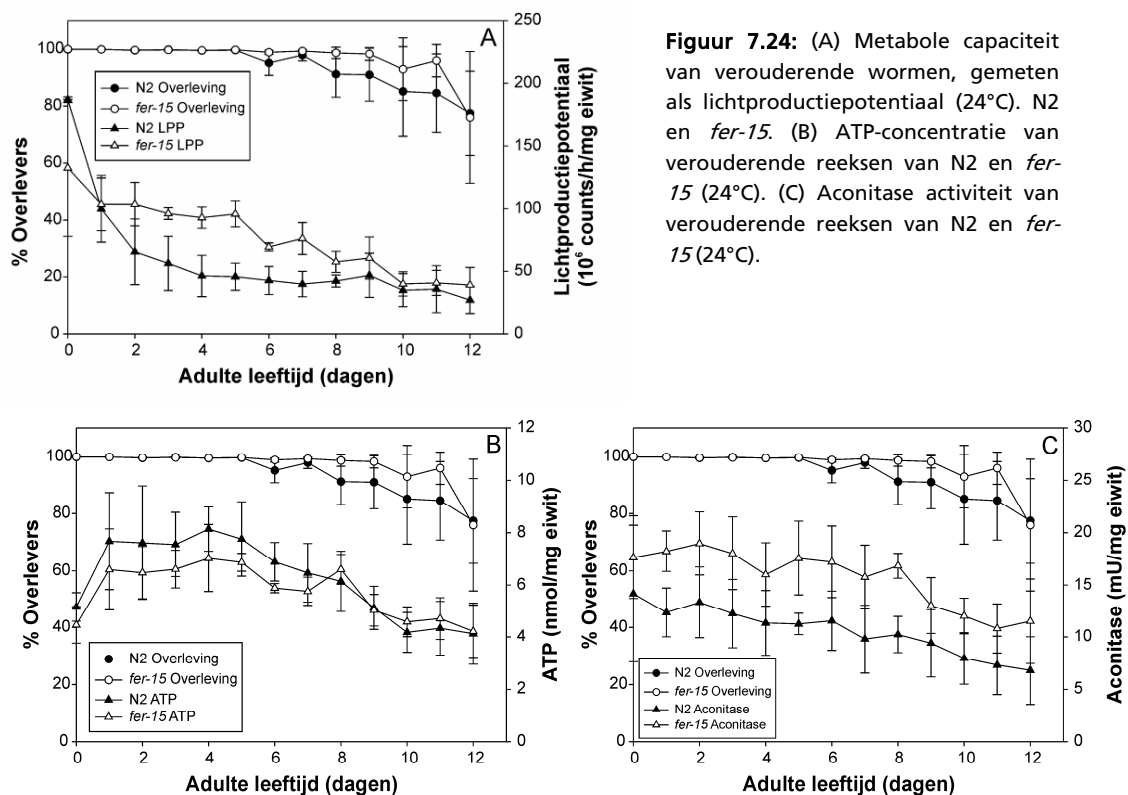


Figuur 7.23: Autofluorescentie profielen van verouderende reeksen van *C. elegans*, gegroeid bij 24°C. (A) B1 autofluorescentie van N2 en *fer-15*. (B) F2 autofluorescentie van N2 en *fer-15*. De foutenvlaggen geven de standaarddeviatie weer.

De LPP *assay* meet de lichtproductie tengevolge van de reactie van endogene superoxiden met gereduceerd lucigenine. De productie van superoxiden wordt gestimuleerd door een hoge membraanpotentiaal. Aangezien NAD(P)H in niet-limiterende hoeveelheden toegediend wordt en het maximaal weglekken van elektronen ter hoogte van complex I en III bevordert wordt door het inhiberen van complex IV, is deze *assay* een maat voor de performantie van de elektronentransportketen (zie ook Hoofdstuk 6.4.2.4). Naarmate de leeftijd van de wormen toeneemt, treedt een geleidelijke ontkoppeling op. Dit gaat gepaard met een daling van de lichtproductie en reflecteert een verminderde efficiëntie van de mitochondriën. Tussen dag 0 en 1 neemt de LPP sterk af in beide stammen (Fig. 7.24A). Merkwaardig genoeg gaat dit gepaard met een stijging van de ATP-concentratie (Fig. 7.24B). De initieel sterke daling van de LPP zou echter een artefact kunnen zijn indien de

metabole capaciteit veel hoger is in het L4 stadium en de populatie niet 100% synchroon is. Zo kan de stijging in de ATP-concentratie tussen dag 0 en 1 verklaard worden door een hoog ATP verbruik in het L4 stadium (voor het beëindigen van de gonadogenese). Indien de eerste twee datapunten buiten beschouwing worden gelaten, blijkt dat de metabole capaciteit in beide stammen gradueel afneemt met toenemende leeftijd ($p = 0,0003$ voor het effect van de leeftijd). Er kon echter geen verschil vastgesteld worden tussen N2 en de *fer-15* mutant ($p = 0,096$ voor het effect van de stam en $p = 0,62$ voor de interactie tussen leeftijd en stam). De ATP-concentratie (Fig. 7.24B) blijft in beide stammen gedurende ongeveer vijf dagen constant en neemt nadien sterk af ($p = 0,0071$ voor het effect van de leeftijd). Er is geen onderscheid tussen N2 en *fer-15* ($p = 0,28$ voor het effect van de stam en $p = 0,303$ voor de interactie tussen leeftijd en stam).

Aconitase is een Krebscyclusenzym dat de omzetting van citraat naar isocitraat katalyseert. Het eiwit is zeer gevoelig aan oxidatieve beschadiging door carbonylatie (Yan *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2001; Bota *et al.*, 2002; Yarian *et al.*, 2006) of door directe inactivering van de 4Fe-4S cluster door superoxide (Gardner en Fridovich, 1991). De activiteit van aconitase daalt in beide stammen gradueel met toenemende leeftijd ($p = 0,0003$ voor het effect van de leeftijd). Hoewel *fer-15* mutanten een iets hogere aconitase activiteit schijnen te hebben dan wild type wormen, is dit verschil toch niet significant ($p = 0,093$ voor het effect van de stam en $p = 0,72$ voor de interactie tussen leeftijd en stam).



7.5.4 Discussie

Het verouderingsproces gaat in *C. elegans* o.a. gepaard met een veranderd metabolisme. Het zuurstofverbruik en de warmteproductie, beide directe indicaties van de metabole activiteit, dalen met toenemende leeftijd. Ook indirecte metingen die een maat zijn voor de metabole toestand waarin de wormen zich bevinden, wijzen op een daling van het metabolisme. Zo is er een exponentiële daling van de beschikbare hoeveelheid ATP en de lichtproductiepotentiaal (LPP). Andere kenmerken van veroudering zijn de accumulatie van geoxideerde proteïnen en lipofuscine (Klass, 1977; Nakamura *et al.*, 1999; Braeckman *et al.*, 2002b; Herndon *et al.*, 2002). Om na te gaan of jonge *C. elegans* populaties (met een overlevingsgraad van minstens 80%), reeds kenmerken van veroudering vertonen, werden een aantal metabole en fysiologische parameters van deze populaties onderzocht. De metabole toestand van de mitochondriën werd beoordeeld door de bepaling van de lichtproductiepotentiaal, de ATP-concentratie en de aconitase activiteit. Ook de geoxideerde flavinen en de geaccumuleerde lipofuscines (*biomarker* van veroudering) werden bepaald.

Bovenstaande resultaten tonen aan dat een aantal trends die typisch geassocieerd zijn met veroudering, zoals de accumulatie van beschadigde moleculen en de achteruitgang van de mitochondriën, reeds waarneembaar zijn in jonge wormen. Eerdere studies die het effect van de leeftijd op fysiologie en metabolisme van *C. elegans* onderzochten, maakten dikwijls gebruik van vloeibare bacteriële culturen (Braeckman *et al.*, 2002b; Houthoofd *et al.*, 2002c). De plateaufase in monoxenische culturen is echter zodanig kort (± 4 dagen in vergelijking met ± 12 dagen in axenische cultuur, eigen observatie) dat het moeilijk uit te maken is of de eerste kenmerken van veroudering al dan niet samenvallen met de eerste sterfgevallen in de populatie. In deze studie werden daarom een aantal metabole en fysiologische parameters van axenisch gekweekte *C. elegans* populaties met een overlevingspercentage van minstens 80% onderzocht.

De opstapeling van lipofuscines en geoxideerde flavinen is waarneembaar vanaf de vervelling tot adulte wormen. Oxidatief beschadigde moleculen beginnen dus reeds vroeg te accumuleren. Eerder werd aangetoond dat lipofuscine accumulatie de mogelijkheid van de cel tot autofagie inhibeert, hoogstwaarschijnlijk omdat een groot deel van de lysosomale enzymen lokaliseren ter hoogte van de lipofuscine-bevattende lysosomen, waar ze vergeefs proberen om het onafbreekbare materiaal te verteren (Terman *et al.*, 1999b). De opstapeling van lipofuscines maakt een cel ook vatbaarder voor oxidatieve schade (Terman *et al.*, 1999a). Bijgevolg heeft de accumulatie van dit materiaal een versterkend effect op de achteruitgang van de cellulaire functies.

De oxidatie van de flavinecofactoren op jonge leeftijd reflecteert een vroegtijdig verlies aan reductieve capaciteit. Een verminderde reductieve capaciteit werd eerder ook al aangetoond in verouderende wormen via een daling van het vermogen om XTT te reduceren (Braeckman *et al.*, 2002b; Houthoofd *et al.*, 2002a). Desondanks heeft dit initieel geen gevolgen voor het metabolisme van jonge wormen. Zo blijft de ATP-concentratie de eerste zes dagen nagenoeg constant. Dit suggereert dat oxidatieve fosforylatie pas in het gedrang komt wanneer een zekere drempelwaarde van remmende factoren overschreden

wordt. Ook de graduele daling van de metabole capaciteit vanaf het begin van de adulte fase gaat tijdens de eerste zes dagen niet gepaard met een daling van de ATP-concentratie, vermoedelijk omdat mitochondriën gewoonlijk werken beneden hun maximale capaciteit. Sommige rapporten suggereren dat een verhoogde productie van ROS in functie van de leeftijd en de daarmee gepaard gaande verhoogde accumulatie van schade aan verschillende componenten van de elektronentransportketen, de oorzaak zouden zijn van de verminderde energieproductie (Sohal en Weindruch, 1996; Lesnefsky en Hoppel, 2006). Recente studies in *C. elegans* tonen echter aan dat veroudering in dit organisme niet gepaard gaat met een verhoogde productie van $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 (Yasuda *et al.*, 2006; Brys *et al.*, 2007). Verouderende wormen vertonen wel een verminderde catalase activiteit (Houthoofd *et al.*, 2002a; zie ook Hoofdstuk 7.6), wat de toename in beschadigde moleculen zou kunnen verklaren.

De activiteit van aconitase, een Krebscyclusenzym dat zeer gevoelig is voor oxidatieve beschadiging (Gardner en Fridovich, 1991; Yan *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2001; Bota *et al.*, 2002; Yarian *et al.*, 2006), vertoont gedurende de eerste acht dagen van de adulte fase geen noemenswaardige daling in activiteit. Nadien is wel een graduele daling waarneembaar. Een verminderde aconitase activiteit beïnvloedt waarschijnlijk de efficiëntie van de hele citroenzuursyclus. Zo blokkeert de inactivering van aconitase het normale transport van elektronen naar zuurstof, met een accumulatie van gereduceerde metabolieten, zoals citraat (Zahavi en Tahori, 1965; Das *et al.*, 2001), tot gevolg. Bovendien zou de opstapeling van citraat in het cytosol kunnen leiden tot de activering van de vetzuursynthese (Yarian *et al.*, 2006).

Bovenstaande resultaten zijn in overeenstemming met recente bevindingen die de leeftijdsafhankelijke veranderingen in de structuur en de functie van de mitochondriën in *C. elegans* beschrijven. Wormen die gekweekt werden op NGM platen met OP50 vertoonden een sterke daling in zuurstofconsumptie op het moment dat nog 95% van de populatie in leven was (Yasuda *et al.*, 2006). Anderen observeerden structurele veranderingen die geassocieerd zijn met veroudering voordat een stijging in de mortaliteit werd geregistreerd (Garigan *et al.*, 2002; Herndon *et al.*, 2002).

Zowel de wild type stam N2 als *fer-15*, een temperatuur sensitieve mutant voor spermatide rijping, werden gebruikt. Hoewel de *fer-15* mutant ingesloten werd ter vervanging van N2 indien deze cultuur gecontamineerd zou zijn met nakomelingen, waren beide stammen vrij van tweede generatie. Hoewel de onderlinge vergelijking van beide stammen dan evident lijkt, moet toch rekening gehouden worden met een belangrijk verschil. Jong-adulte wild type wormen zullen namelijk dode embryo's bevatten, terwijl *fer-15* mutanten enkel oöcyten bevatten. Bijgevolg zijn de twee stammen niet 100% vergelijkbaar. Over het algemeen waren er weinig verschillen tussen beide stammen. Zowel de metabole capaciteit als de aconitase activiteit zijn in de *fer-15* mutanten iets hoger dan in N2. Hoewel deze verschillen net niet significant waren, suggereren ze toch een goede werking van de mitochondriën, wat in overeenstemming is met de eerdere observatie dat *fer-15* mutanten iets langer leven dan wild type wormen (Vanfleteren en De Vreese, 1995). Er was geen onderscheid in ATP productie tussen N2 en *fer-15* mutanten. Er werd echter verwacht dat de ATP-concentratie in N2 lager zou zijn dan in *fer-15*, omdat wild type wormen veel

energie verbruiken voor de ontwikkelende embryo's. Omdat FUDR werd toegevoegd, kan de embryogenese enkel starten, maar niet voltooid worden, wat zou kunnen verklaren waarom de ATP-concentratie in beide stammen gelijk is. Het is namelijk vooral de productie van oöcyten, en niet de activering van de spermatiden die veel energie vergt (Tsang en Lemire, 2002). De hogere accumulatie van lipofuscines (en mogelijk ook van geoxideerde flavinen) in *fer-15* in vergelijking met wild type dieren is echter moeilijk te verzoenen met de langere levensduur van deze mutant. Deze resultaten suggereren dan ook dat de accumulatie van lipofuscines niet de oorzaak is van veroudering. Het feit dat de meeste verschillen tussen N2 en de *fer-15* mutanten net niet significant waren, illustreert bovendien het belang van te investeren in een aanzienlijk aantal replica's.

Tot besluit kan gesteld worden dat verschillende kenmerken van veroudering zich reeds manifesteren in jonge *C. elegans* populaties. Deze waarnemingen zijn echter louter correlatief van aard. Of de geobserveerde veranderingen ook de oorzaak zijn van veroudering, is hiermee niet bewezen.

7.6 Bepaling van de SOD activiteit in *C. elegans*: optimalisatie van een methode gebaseerd op chemiluminescentie en onderzoek naar stressresistentie in langlevende wormen

7.6.1 Optimalisatie van de SOD assay

Gepubliceerd als:

Lenaerts, I., Braeckman, B.P., Matthijssens, F., Vanfleteren, J. (2002). A high-throughput microtiter plate assay for superoxide dismutase based on lucigenin chemiluminescence. *Analytical Biochemistry* **311**, 90-92.

Persoonlijke bijdrage aan dit hoofdstuk:

Al het experimenteel werk i.v.m. de optimalisatie van de *assay*.

7.6.1.1 Inleiding

Het is goed gekend dat de oxidatieve beschadiging van biologische moleculen een belangrijke rol speelt in het verouderingsproces en bij de ontwikkeling van ziekten (Berlett en Stadtman, 1997; Finkel en Holbrook, 2000). Reactieve zuurstofderivaten (ROS) zoals het superoxide anion en waterstofperoxide, worden gevormd als nevenproducten van het metabolisme. Vooral mitochondriale respiratie speelt hierbij een belangrijke rol. Superoxide wordt gevormd wanneer elektronen tijdens het transport over de mitochondriale elektronentransportketen direct worden overgedragen op zuurstof. Superoxidedismutase (SOD), dat de omzetting van superoxide tot waterstofperoxide katalyseert (Fig. 7.25), en

catalase en glutathion peroxidase zijn sleutelcomponenten in de cellulaire defensie tegen deze ROS. Dieren bezitten verschillende SOD isovormen. Cu/Zn-bevattende isovormen worden teruggevonden in het cytosol. Deze enzymen zijn gevoelig voor inactivering door cyanide. Mn-bevattende isovormen bevinden zich in de mitochondriën en zijn cyanide resistent.



Figuur 7.25: De omzetting van superoxide tot waterstofperoxide door SOD.

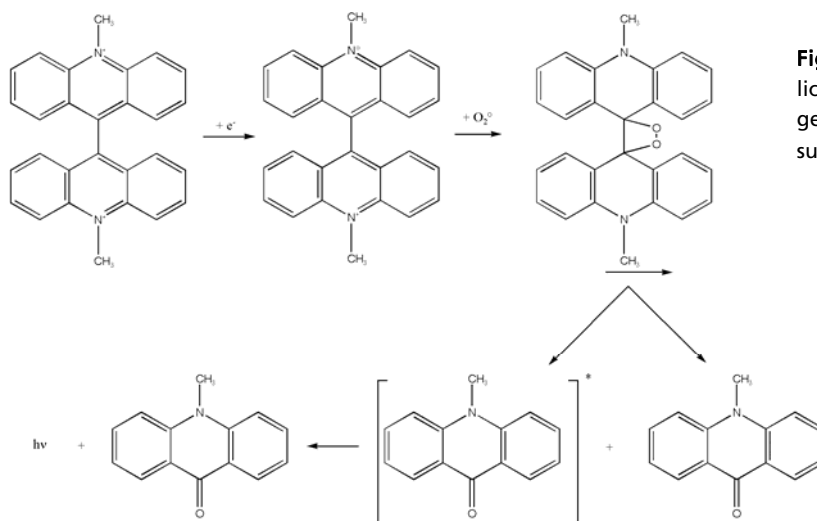
Verschillende methoden voor de bepaling van de SOD activiteit zijn voorhanden. Deze technieken maken gewoonlijk gebruik van xanthine en xanthine oxidase voor de gecontroleerde productie van superoxide. De *nitroblue* tetrazolium (NBT) *assay* (Beauchamp en Fridovich, 1971) is een voorbeeld van zulke methode. Hierbij wordt NBT gereduceerd door $\text{O}_2^{\bullet-}$ met de vorming van een onoplosbaar, blauw formazan tot gevolg. De activiteit van SOD inhibeert de vorming van dit formazan. De meest gebruikte techniek is echter de cytochroom *c assay* (Crapo *et al.*, 1978). Cytochroom *c* wordt gebruikt als chromofoor voor de reactie en als terminale elektronen acceptor. De reductie van cytochroom *c* door superoxide wordt opgevolgd bij 550 nm in een 3 ml kuvet met een weglengte van 1 cm. Het toevoegen van SOD aan deze reactie inhibeert de reductie van cytochroom *c*. In zijn oorspronkelijke vorm is deze methode echter niet erg gevoelig en nogal arbeidsintensief. Bovendien mislukten al onze pogingen om deze techniek aan te passen voor gebruik in een 96-well formaat. Een alternatieve methode op basis van de inhibitie van de superoxide-geïnduceerde lucigenine luminescentie door SOD, werd voorgesteld door Corbisier en collega's (1987).

In de huidige studie wordt een gevoelige en betrouwbare techniek beschreven voor de bepaling van de SOD activiteit op basis van chemiluminescentie in een microtiterplaat formaat.

7.6.1.2 Materiaal en methoden

7.6.1.2.1 *Rationale van de assay*

Het xanthine/xanthine oxidase (XO) koppel wordt gebruikt voor het op gang brengen van een stroom van superoxide anionen. Lucigenine wordt eerst gereduceerd door niet-gedefinieerde reductasen aanwezig in weefsel extracten en als contaminatie in het xanthine oxidase, en reageert vervolgens met superoxide. Het gevormde dioxetaan valt uiteen in twee moleculen acridon, waarvan één molecule zich in de geëxciteerde toestand bevindt en een foton uitzendt bij het terugvallen naar de grondtoestand (Fig. 7.26) (Faulkner en Fridovich, 1993). SOD treedt in competitie met lucigenine voor reactie met het superoxide en veroorzaakt zo een reductie van de luminescentie-intensiteit. In de huidige studie wordt 1 unit (U) SOD activiteit gedefinieerd als de hoeveelheid enzym die nodig is om de luminescentie-intensiteit met 50% te verminderen onder de condities van de *assay* (6.7 µl staal in 200.7 µl reactiemengsel, pH 9.0, bij 25°C).



Figuur 7.26: Mechanisme van lichtproductie na reactie van gereduceerd lucigenine met superoxide.

7.6.1.2.2 Reagentia

De *assay* buffer (oplossing A) is een 0.1 M glycine buffer met 1 mM EDTA, die op pH 9.0 gebracht werd met NaOH en bewaard wordt bij 4°C. Oplossing B, 0.108 mM xanthine in dubbel gedestilleerd water, wordt gedurende maximaal 2 à 3 weken bewaard bij 4°C. Oplossing C bevat 1 mM lucigenine in dubbel gedestilleerd water en wordt dagelijks bereid. Een hoeveelheid reactiemengsel die voldoende is voor een volledige microtiterplaat wordt bereid door het samenvoegen van 5.2 ml oplossing A, 10 ml oplossing B, 2.1 ml oplossing C en 1.2 ml water. Oplossing D, XO, wordt bereid door XO te verdunnen in gedestilleerd water zodat de blanco (6.7 µl water, 20 µl XO verdunning en 174 µl reactie mengsel) een lichtproductie van ongeveer 1.2×10^5 counts/s oplevert. Een minder actieve XO verdunning produceert minder licht, wat de gevoeligheid van de techniek vermindert.

7.6.1.2.3 Chemiluminescentie assay

De optimale reactiecondities werden bepaald door gebruik te maken van *C. elegans* homogenaten als bron van SOD activiteit. De wormen werden gegroeit onder standaard condities (Sulston en Hodgkin, 1988; Braeckman *et al.*, 2002) en gehomogeniseerd met een Mini-Beadbeater (Biospec products, Bartlesville, USA), aan 5000 slagen/min gedurende 1 min, in 2 ml centrifugeerbuisjes met ongeveer gelijke hoeveelheden worm suspensie, glaspereels (0.249-0.318 µm) en 50 mM Na/K fosfaat buffer, pH 7.8. Aan het resulterende homogenaat werd 1% Chaps (finale concentratie) toegevoegd. De stalen werden gedurende 15 min geïncubeerd op ijs en 10 min gecentrifugeerd aan 14 000 rpm bij 4°C. Het supernatans werd overgebracht naar een nieuw buisje en geklaard door een tweede centrifugatiestap.

Voor de bepaling van de SOD activiteit wordt het homogenaat verdund in gedestilleerd water. De gekozen verdunningsreeks hangt af van het eiwitgehalte van het staal. De meest gebruikte verdunningsreeks bestaat uit de volgende staalfracties: 1/100, 1/60, 1/40, 1/27,

1/20, 1/15 en 1/10. 6.7 µl fracties van elke verdunning worden in tweevoud in een well van een witte vlak-bodem 96-well microtiterplaat (Greiner, Frickenhausen, Duitsland) gebracht. Vervolgens wordt met een *multichannel* pipettor aan elke well 20 µl XO en 174 µl reactiemengsel toegevoegd. Om de kinetiek van de luminescentie te volgen, wordt elke well gedurende 0.1 s gemeten bij 25°C en dit gedurende de periode die nodig is voor 25 opeenvolgende plaat-metingen.

7.6.1.2.4 Berekening van de SOD activiteit

Voor elke well worden de luminescentie-intensiteiten van de 25 opeenvolgende metingen geïntegreerd en het gemiddelde van de twee replica's wordt berekend. De bekomen waarden worden uitgezet in functie van de gebruikte staalfracties. Wegens de activiteit van SOD zal de resulterende curve exponentieel dalen met toenemende staalfractie. De 3-parameter exponentiële vervalvergelijking:

$$y = ae^{-bx} + y_0 \quad (1)$$

wordt gefit op de data, met y het aantal geïntegreerde luminescentie *counts*, a de SOD-afhankelijke reductie van de luminescentie, y_0 de theoretische residuele luminescentie bij oneindige SOD concentratie (gewoonlijk ongeveer 5% van a), b de verval constante en x de staalfractie ($x = 1$ voor onverdund homogenaat). Het intercept met de y -as ($a + y_0$) stelt de luminescentie-intensiteit voor in afwezigheid van SOD (blanco).

Eén unit SOD wordt gedefinieerd als de hoeveelheid SOD die in staat is om de lucigenine luminescentie-intensiteit met 50% te verminderen:

$$y = \frac{a + y_0}{2} \quad (2)$$

De homogenaatfractie die nodig is om een 50% inhibitie van de luminescentie te veroorzaken, wordt afgeleid uit (1) en (2):

$$ae^{-bx} + y_0 = \frac{a + y_0}{2},$$

$$x = \frac{\ln\left(\frac{a - y_0}{2a}\right)}{-b}.$$

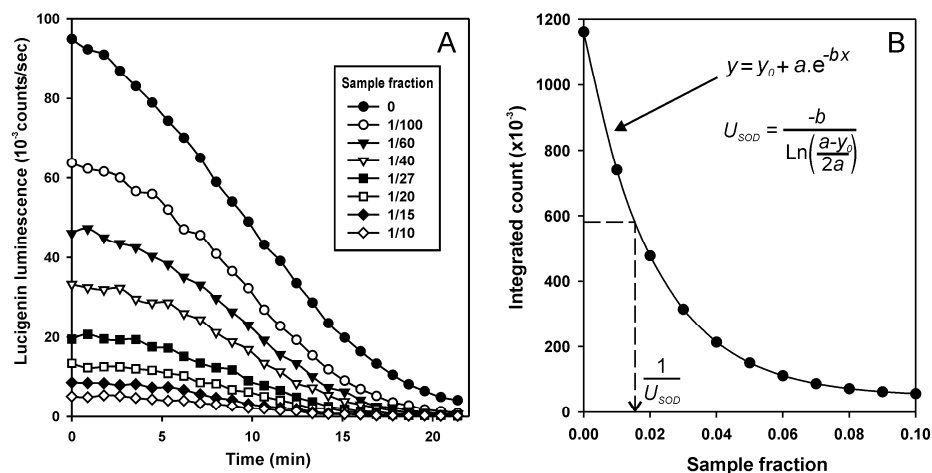
Het staal werd $1/x$ keren verdund om 1 unit SOD te bekomen. De totale SOD activiteit ($U_{\text{SOD}} = 1/x$) in het onverdunde staal is daarom gelijk aan:

$$U_{\text{SOD}} = \frac{-b}{\ln\left(\frac{a - y_0}{2a}\right)}.$$

Tenslotte wordt de SOD activiteit genormaliseerd ten opzicht van de hoeveelheid eiwit door gebruik te maken van de standaard BCA *assay* (Braeckman *et al.*, 2002).

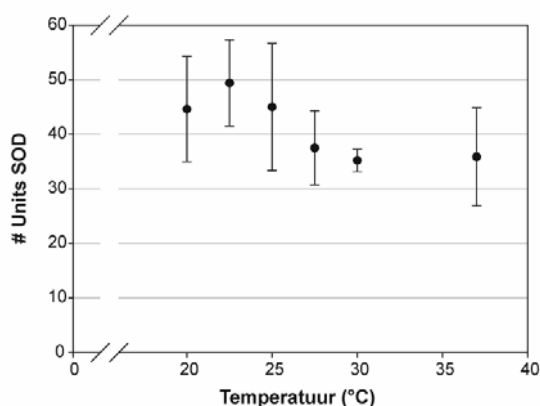
7.6.1.3 Resultaten en discussie

Figuur 7.27A toont de profielen van de lucigenine luminescentie-intensiteiten in functie van de tijd, voor verschillende staalverduunningen. De inhibitie van de luminescentie door SOD en de berekening van 50% inhibitie worden weergegeven in figuur 7.27B.



Figuur 7.27: (A) Lucigenine luminescentie in functie van de tijd, in aanwezigheid van verschillende staalverduunningen. (B) Geïntegreerde luminescentie-intensiteiten in functie van de fractie homogenaat. De curve werd gefit op de experimentele data. De fractie homogenaat die 50% inhibitie van de luminescentie veroorzaakt, bevat 1 U SOD activiteit.

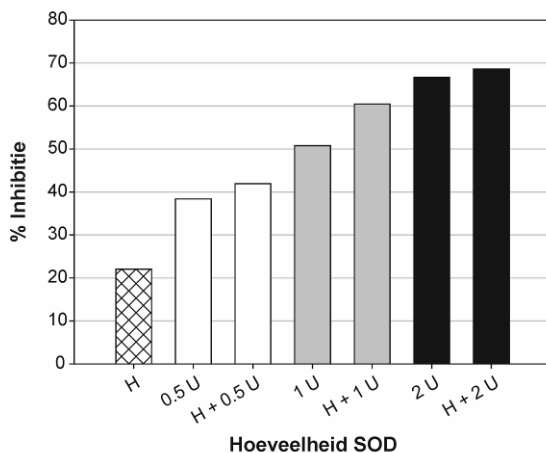
Er moet opgemerkt worden dat de luminescentie-intensiteiten aanzienlijk variëren naargelang de temperatuur van de *assay*. De finale schatting van de SOD activiteit blijkt echter niet afhankelijk te zijn van de temperatuur in de *range* van 20-37°C ($p = 0.779$ *one-way* ANOVA) (Fig. 7.28).



Figuur 7.28: Bepaling van de SOD activiteit in functie van de temperatuur.

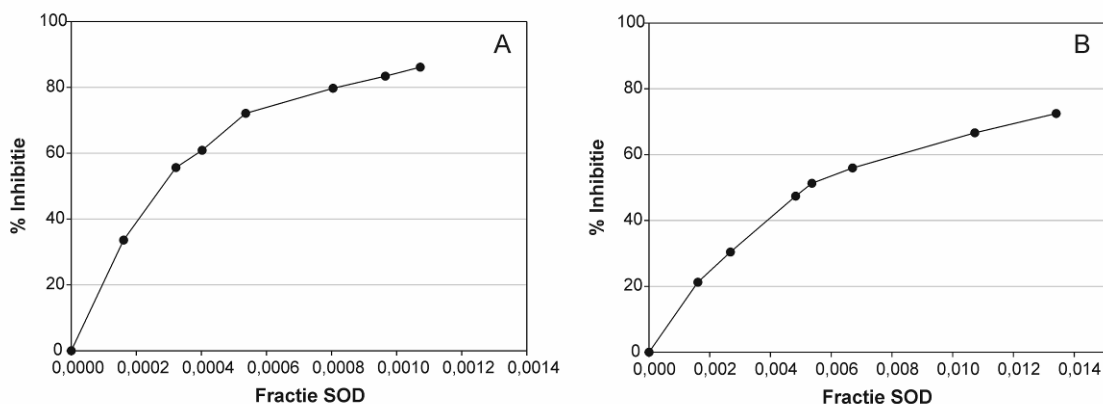
Het toevoegen van een gekende hoeveelheid exogeen SOD aan een homogenaatverduunning had een additieve inhibitie van de lichtproductie tot gevolg die varieerde naargelang de toegevoegde concentratie (Fig. 7.29). Het toevoegen van 1 U SOD aan een homogenaatverduunning die 20% inhibitie veroorzaakte, had een versterking van de inhibitie van de lichtproductie tot gevolg. Een 2x hogere concentratie exogeen SOD in

combinatie met dezelfde homogenaatverdunding veroorzaakte een inhibitie van de lichtproductie die niet hoger was dan deze van het afzonderlijke exogene SOD. Een 2x lagere concentratie exogeen SOD had slechts een zeer beperkt additief effect op de inhibitie van de lichtproductie. Deze resultaten waren niet geheel onverwacht, aangezien een SOD ijklijn, ongeacht de gebruikte methode, steeds afbuigt bij hogere SOD concentraties, om een maximale inhibitie van ongeveer 70 à 90% te veroorzaken (Fig. 7.30) (zie ook Beauchamp en Fridovich, 1971; Corbisier *et al.*, 1987; Spitz en Oberley, 1989). Een inhibitie van 100% wordt dus nooit bereikt. De maximale inhibitie die in dit experiment vastgesteld werd, bedraagt ongeveer 70%, aangezien het toevoegen van 2 U SOD aan de homogenaatverdunding geen effect had op het percentage inhibitie. Omdat het percentage inhibitie eerst afbuigt alvorens een plateau fase te bereiken, zal de inhibitie van de lichtproductie in de nabijheid van deze plateau fase niet evenredig toenemen in functie van de SOD concentratie. Vermoedelijk daarom veroorzaakt het toevoegen van 1 U exogeen SOD aan de homogenaatverdunding geen inhibitie van 70%, maar slechts van 60%. Waarom de laagste concentratie exogeen SOD geen sterker additief effect heeft op het percentage inhibitie van de homogenatverdunding is niet duidelijk. Dit experiment werd slechts 1x uitgevoerd.



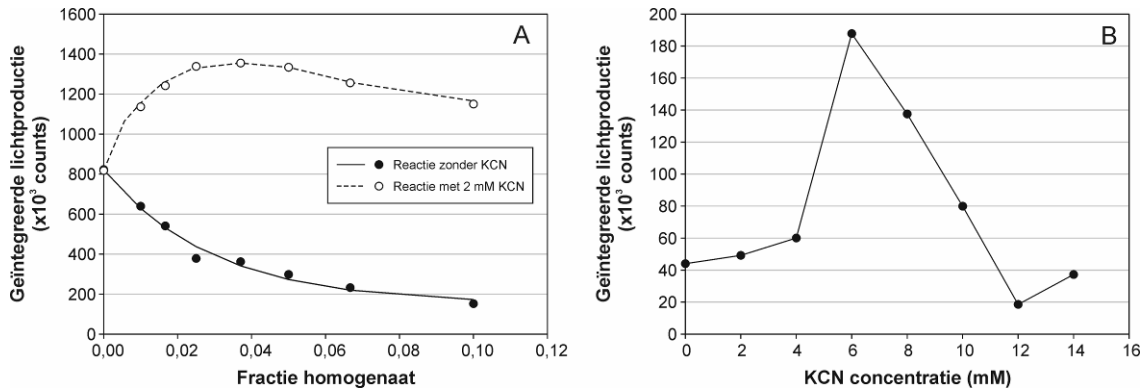
Figuur 7.29: Inhibitie van de lucigenine luminescentie door een homogenaatverdunding (H), in aan-of afwezigheid van exogeen Cu/ZnSOD. De gebruikte Cu/ZnSOD concentraties bedragen 0.5 U, 1 U en 2 U.

Zoals vermeld, wordt een maximale inhibitie van 100% nooit bereikt. De verklaring hiervoor is te vinden in de definitie van een SOD unit. Eén unit SOD veroorzaakt een vermindering van de totale lichtproductie met 50%. Een tweede unit SOD zal de lichtproductie niet plots voor de volle 100% doen verdwijnen, maar vermindert de resterende lichtproductie opnieuw met 50%, enz. Op deze manier wordt een totale inhibitie dus nooit bereikt. Behalve deze wiskundige verklaring, is voor sommige substraten ook een mechanistische verklaring voorhanden. Zo werd bv. beschreven dat XO niet alleen onrechtstreeks (via de vorming van $O_2^{\cdot-}$) reageert met NBT. XO zou onder sommige (anaerobe) omstandigheden ook rechte reeks elektronen naar NBT kunnen transfereren en dit reactiemechanisme blijkt niet te worden beïnvloed door SOD (Beauchamp en Fridovich, 1971).



Figuur 7.30: (A) Cu/ZnSOD ijklijn gemeten met lucigenine assay. (B) Cu/ZnSOD ijklijn gemeten met cytochroom c assay.

Om aan te tonen dat de inhibitie van de lichtproductie specifiek is voor de activiteit van SOD, werd 2 mM KCN, een krachtige inhibitor van het Cu/ZnSOD, aan het reactiemengsel toegevoegd. 2 mM cyanide verhinderde de mogelijkheid van homogenaatverduningen om de lichtproductie te inhiberen, wat de specificiteit van de methode bevestigt (Fig. 7.31A). Opvallend is dat de toevoeging van cyanide aan het reactiemengsel de lichtproductie versterkt in vergelijking met het reactiemengsel zonder cyanide. Dit is waarschijnlijk te verklaren door het feit dat complex IV van de mitochondriale elektronentransportketen eveneens geïnhibeerd wordt door KCN. De elektronen die door de nog functionele elektronentransportketens in het wormhomogenaat stromen, worden dus geblokkeerd ter hoogte van complex IV en op die manier geforceerd om weg te lekken ter hoogte van complex I en III. Deze toename in superoxideproductie zou dan een stijging van de lichtproductie kunnen veroorzaken. Hogere concentraties cyanide veroorzaken bovendien een nog grotere toename in luminescentie (Fig. 7.31B). Vanaf een concentratie van 6 mM KCN neemt de lichtproductie weer af. Wat de precieze oorzaak is van de interferentie van KCN met de lucigenine luminescentie is niet helemaal duidelijk. Er werd aangetoond dat het mechanisme van NBT reductie door superoxide rechtstreeks beïnvloed wordt door cyanide (Spitz en Oberley, 1989). Naar analogie met deze bevindingen is het mogelijk dat cyanide de reductie van lucigenine door superoxide versterkt, met een verhoogde lichtproductie tot gevolg. Bij zeer hoge concentraties KCN is niet meer voldoende lucigenine voorhanden, wat een daling van de luminescentie veroorzaakt vanaf een concentratie van 6 mM. Bovendien inhibeert cyanide ook het enzym catalase, wat vermoedelijk aanleiding geeft tot een verhoogde vorming van H_2O_2 en ook OH^\bullet in het reactiemengsel (Spitz en Oberley, 1989). Dit zou op zijn beurt de reductie van lucigenine kunnen beïnvloeden. Tenslotte zou cyanide ook kunnen interageren met de activiteit van XO, met een afwijkende lichtproductie tot gevolg.



Figuur 7.31: (A) De inhibitie van de lichtproductie door SOD wordt verhinderd door het toevoegen van 2 mM KCN. (B) Lucigenine luminescentie in functie van een stijgende KCN concentratie.

De specifieke inhibitie van Cu/ZnSOD door cyanide zou moeten toelaten om de afzonderlijke bijdragen van Cu/Zn- en Mn-SOD aan de totale SOD activiteit te bepalen. Na toevoegen van 2 mM KCN bleef echter nog ongeveer 10% Cu/ZnSOD activiteit meetbaar bij pH 7.8. Dit stemt overeen met een eerder rapport waarin werd vastgesteld dat 2 mM cyanide de Cu/ZnSOD activiteit reduceert met 94% (Geller en Winge, 1983). In deze *assay* werd een lagere pH gebruikt omdat MnSOD bij hogere pH minder actief is ten opzichte van Cu/ZnSOD. Het Cu/ZnSOD blijkt nl. 10x actiever te zijn bij pH 10 dan bij pH 7.8, terwijl MnSOD bij deze hogere pH slechts 2x actiever is (Crapo *et al.*, 1978). Rekening houdend met de toename in lichtproductie van het reactiemengsel in aanwezigheid van zowel homogenaat als een stijgende concentratie cyanide, werd geconcludeerd dat de MnSOD activiteit niet betrouwbaar kan bepaald worden met deze *assay* indien deze SOD isovorm slechts een klein deel uitmaakt van de totale SOD activiteit.

Tenslotte werd het verschil in gevoeligheid onderzocht tussen de hier voorgestelde methode en de cytochroom *c* *assay*. Dit gebeurde door te bepalen hoeveel SOD nodig is om de reductie van cytochroom *c*, of om de lichtproductie in de lucigenine *assay* met 50% te verminderen (Fig. 7.30). In de cytochroom *c* *assay* was een SOD fractie van 0.005 noodzakelijk om 50% inhibitie te veroorzaken van de reductie van cytochroom *c*. In de lucigenine *assay* daarentegen, was een SOD fractie van slechts 0.00025 voldoende om de lichtproductie met 50% te verminderen. Dit betekent dat de methode voor de bepaling van de SOD activiteit op basis van chemiluminescentie ongeveer 20x gevoeliger is dan de methode op basis van cytochroom *c*. Bemerk dat de SOD units uit beide protocols niet vergelijkbaar zijn, aangezien de reactie condities onder beide omstandigheden sterk verschillen (kamertemperatuur t.o.v. 25°C, kuvet t.o.v. microtiterplaat, pH 7.8 t.o.v. pH 9.0).

7.6.1.4 Besluit

De hier voorgestelde methode is gevoelig en zeer goed geschikt voor de hoge-doorvoer bepaling van de SOD activiteit in biologische systemen. De meting van 8 verdunningen (telkens in 2 replica's) van 6 verschillende stalen neemt ongeveer 20 min in beslag, en de

analyse van de ruwe data (gebruik makend van geschikte macro's in Excel) verloopt uitzonderlijk snel. Het microtiterplaat formaat en de verhoogde gevoeligheid van deze techniek laten bovendien toe dat de SOD activiteit gemeten wordt door gebruik te maken van aanzienlijk kleinere hoeveelheden staal.

7.6.2 Antioxideratieve enzymactiviteiten in langlevende wormen

Gepubliceerd, in samenwerking met collega's, als:

Houthoofd, K., Fidalgo, M.A., Hoogewijs, D., Braeckman, B.P., Lenaerts, I., Brys, K., Matthijssens, F., De Vreese, A., Van Eygen, S., Muñoz, M.J., Vanfleteren, J. (2005b). Metabolism, physiology and stress defence in three aging *Ins/IGF-1* mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 4, 87-95.

Braeckman, B.P., Houthoofd, K., Brys, K., Lenaerts, I., De Vreese, A., Van Eygen, S., Raes, H., Vanfleteren, J. (2002a). No reduction of energy metabolism in *Clk* mutants. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 1447-1456.

Houthoofd, K., Braeckman, B., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J. (2002a). Ageing is reversed, and metabolism is reset to young levels in recovering dauer larvae of *C. elegans*. *Experimental Gerontology* 37, 1015-1021.

Houthoofd, K., Braeckman, B., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J. (2002c). No reduction of metabolic rate in food restricted *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 37, 1359-1369.

Houthoofd, K., Braeckman, B., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J. (2002b). Axenic growth up-regulates maas-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 37, 1371-1378.

Persoonlijke bijdrage aan dit hoofdstuk:

- Optimalisatie van de SOD *assay*
- Bepaling van de SOD activiteiten van langlevende wormen (geen dataverwerking)

7.6.2.1 Inleiding

Bescherming tegen stresserende omgevingscondities werd naar voor geschoven als een belangrijke factor in de bepaling van de levensduur. Zo werd herhaaldelijk gewezen op een mogelijke connectie tussen oxidatieve stress en het verouderingsproces (Finch, 1990; Johnson *et al.*, 2001; Lithgow en Walker, 2002). Er werd aangetoond dat de activiteit van zowel SOD als catalase cruciaal is voor de bescherming van *C. elegans* tegen oxidatieve stress (Blum en Fridovich, 1983). Met de identificatie van de langlevende *C. elegans* mutanten *age-1* (Friedman en Johnson, 1988) en *daf-2* (Kenyon *et al.*, 1993) werd voor het eerst ook een bewijs gevonden voor een positieve correlatie tussen de activiteit van deze antioxideratieve enzymen en een verlengde levensduur in deze nematode (Larsen, 1993;

Vanfleteren, 1993; Vanfleteren en De Vreese, 1995). Zo bleek de activiteit van SOD en catalase steeds hoger te zijn in de *age-1* en *daf-2* mutanten dan in wild type wormen.

C. elegans bezit vijf SOD isovormen. *sod-1*, *sod-4* en *sod-5* koderen voor verschillende Cu/ZnSOD's. *sod-1* en *sod-5* komen tot expressie in het cytosol (Larsen, 1993; Giglio *et al.*, 1994; Jensen en Culotta, 2005). *sod-4* geeft door alternatieve *splicing* aanleiding tot een extracellulair en een membraan-gebonden SOD (Fuji *et al.*, 1998). *sod-2* en *sod-3* tenslotte, koderen voor mitochondriale MnSOD isovormen (Suzuki *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1997). In tegenstelling tot de meeste zoogdieren, komen er in *C. elegans* drie catalase genen tot expressie (Taub *et al.*, 1999; Petriv en Rachubinski, 2004). *ctl-1* en *ctl-3* koderen voor ongewone cytosolische vormen, terwijl *ctl-2* tot expressie komt in de peroxisomen. Het meest actieve catalase is CTL-2, dat 80% van de totale catalase activiteit uitmaakt.

In deze studie werd systematisch de SOD en catalase activiteit van een aantal langlevende wormen onderzocht.

7.6.2.2 Materiaal en Methoden

Het kweken van *C. elegans* en het nemen van stalen gebeurde zoals eerder beschreven (Braeckman *et al.*, 2002b). Grote, synchrone wormpopulaties werden bekomen door juvenielen, na chloroxen en uitsluipen uit het ei, bij 17°C te kweken op Nutriënt Agarplaten met een laagje *E. coli*. Wanneer de wormen het adulte stadium naderden, werden ze van de platen gespoeld en overgebracht naar Fernbachflessen met 250 ml S-buffer, 3×10^9 *E. coli* cellen/ml en 50 μ M FudR (finale concentratie) om reproductie te verhinderen. De culturen werden vervolgens geschud aan 120 rpm bij 24°C. Deze shift in temperatuur is noodzakelijk om temperatuursensitieve mutanten eerst de kans te geven te ontwikkelen tot het adulte stadium. De voedselconcentratie werd constant gehouden door dagelijks de OD₅₅₀ te meten en indien nodig de culturen bij te voederen met ingevroren *E. coli* bolletjes. Deze ingevroren bacteriën worden bereid door gewassen *E. coli* cellen (gesuspendeerd in een gelijk volume S-buffer) te druppelen in vloeibare stitof. De bevroren bolletjes worden vervolgens bewaard bij -75°C tot gebruik. Axenische culturen werden bekomen door dubbel-gechloroxte juvenielen in axenisch medium met geautoclaveerde bacteriën (3×10^9 cellen/ml) op te groeien. Op het moment dat de wormen het jong-adulte stadium naderden werd het medium verwijderd en werden de nematoden gewassen met S-buffer om de resten *E. coli* te verwijderen. Vervolgens werden ze overgebracht naar vers axenisch medium met 50 μ M FudR (finale concentratie).

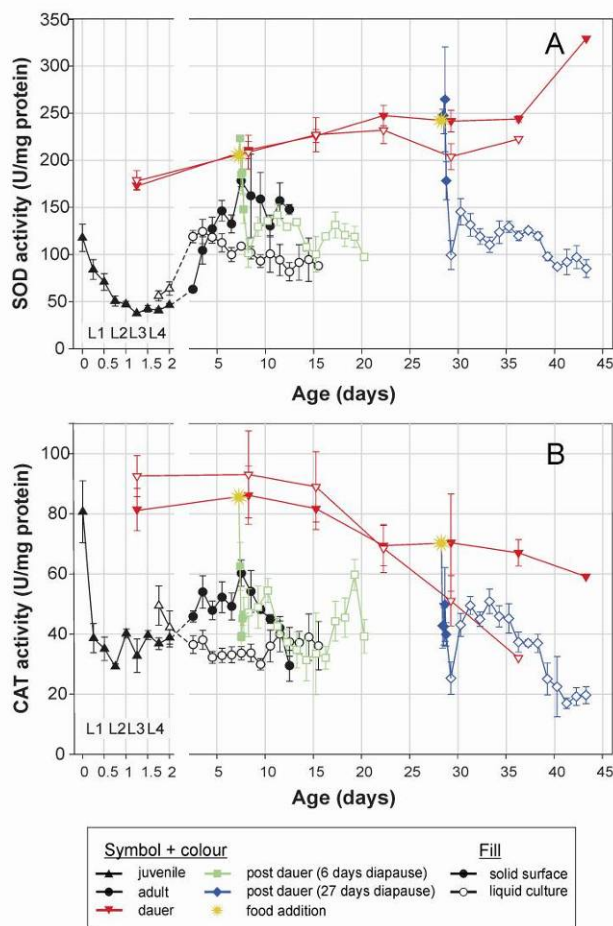
Op regelmatige tijdstippen werd een deel van de culturen geoogst. Dode wormen werden verwijderd door de stalen te centrifugeren door 36% Percoll in S-buffer (Fabian en Johnson, 1994). De levende wormen, die een hogere dichtheid hebben, zakken doorheen deze Percoll oplossing, terwijl de dode wormen blijven drijven. De levende wormen werden gerecupereerd en gewassen met 40% sucrose om de dode bacteriën te verwijderen (Sulston en Hodgkin, 1988). Na centrifugatie blijven wormen drijven op deze sucrose-oplossing, terwijl de bacteriën naar de bodem zakken door opname van sucrose. Tenslotte werden de wormen 3x gewassen en geconcentreerd in S-buffer, uitverdeeld in 2 ml centrifugeerbuisjes

en bewaard bij -75°C tot gebruik. Voor de gecombineerde bepaling van de SOD en catalase activiteit was een enkel staal van 100 μl vereist. Dit bevatte ongeveer 2000 wormen.

7.6.2.3 Resultaten

7.6.2.3.1 Dauers

C. elegans reageert op ongunstige omgevingscondities door zijn ontwikkeling stop te zetten bij de tweede vervelling, waarna een alternatief dauerstadium gevormd wordt (Albert en Riddle, 1988). Dauers hebben een aangepast metabolisme en leven veel langer dan normaal (Burnell *et al.*, 2005). Bovendien heeft de lengte van het dauerstadium geen invloed op de post-dauer levensduur, wat leidde tot de suggestie dat dauers niet verouderen en uiteindelijk sterven door verhongering. Deze veronderstelling werd echter weerlegd (Houthoofd *et al.*, 2002a). Dauers vertonen wel degelijk een aantal kenmerken van veroudering, maar deze worden omgekeerd wanneer de wormen het dauerstadium verlaten. De SOD en catalase activiteiten (Fig. 7.32) zijn bovendien aanzienlijk verhoogd in dauers, wat in overeenstemming is met eerdere resultaten (Anderson, 1982; Larsen, 1993; Vanfleteren en De Vreese, 1995).

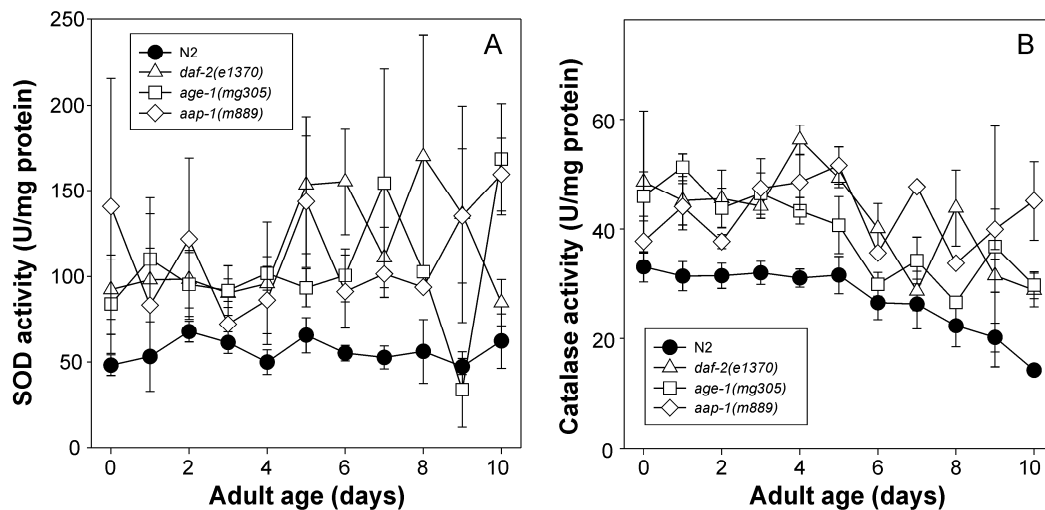


Figuur 7.32: Enzymactiviteiten in functie van ontwikkeling en veroudering. Volle lijnen duiden op opeenvolgende staalnames uit dezelfde oorspronkelijke populatie; stippellijnen tussen symbolen geven aan dat de data afkomstig zijn uit verschillende experimentele populaties. (A) SOD activiteit. (B) Catalase activiteit. L1, L2, L3, L4 duiden respectievelijk het eerste, tweede, derde en vierde larvale stadium aan. Gemiddelde van drie à zes replica's. De foutenvlaggen geven de standaardfout weer.

Opvallend is dat na het toevoegen van voedsel, de ontwikkeling van dauers tot adulten gepaard gaat met een drastische verlaging van de SOD en catalase activiteiten tot een niveau dat normaal wordt waargenomen in volwassen dieren. Uit de grafiek kan ook afgeleid worden dat adulte wormen op vaste voedingsbodems gewoonlijk hogere enzymactiviteiten hebben in vergelijking met wormen in vloeibare cultuur. Dit is mogelijk een adaptieve respons op de 30 maal hogere concentratie aan zuurstof in de lucht.

7.6.2.3.2 Insuline/IGF-1 mutanten

Eerdere studies in *C. elegans* toonden aan dat *daf-2(e1370)* mutanten langer leven, resistenter zijn tegen stress en een hogere SOD en catalase activiteit hebben in vergelijking met wild type wormen (Larsen, 1993; Vanfleteren en De Vreese, 1995; Houthoofd *et al.*, 2003b). Dit fenotype is waarschijnlijk een gevolg van een gereduceerde activiteit van de DAF-2/insuline *pathway*. Andere verklaringen kunnen echter niet uitgesloten worden. Zo zouden deze effecten allel-specifiek kunnen zijn, of zouden ze kunnen veroorzaakt worden door de activiteit van een ander signaaltransductiepad waarbij ook DAF-2, maar niet PI-3-kinase betrokken is. Overtuigende bewijzen voor het bestaan van zo'n parallelle *pathway* werden reeds geleverd (Gems *et al.*, 1998; Wolkow *et al.*, 2002; Hertweck *et al.*, 2004). Om deze mogelijkheden te onderzoeken, werden de effecten van mutaties in *daf-2(e1370)*, *aap-1(m889)* en *age-1(mg305)* op de activiteit van stressdefensie enzymen onderzocht. Zoals eerder vermeld (zie Hoofdstuk 4.3.1.2) codeert *daf-2* voor de insuline/IGF-1 receptor. *aap-1* codeert voor de regulatorische subunit van het PI-3-kinase, terwijl *age-1* codeert voor de katalytische subunit. Wormen met een mutatie in één van deze genen leven aanzienlijk langer dan wild type wormen (Houthoofd *et al.*, 2005b). De SOD activiteit van de drie insuline/IGF-1 mutanten was ongeveer dubbel zo hoog in vergelijking met wild type wormen (Fig. 7.33A) ($p < 0.001$, *two-way* ANOVA). Ook de catalase activiteit was hoger (Fig. 7.33B, $p < 0.001$).

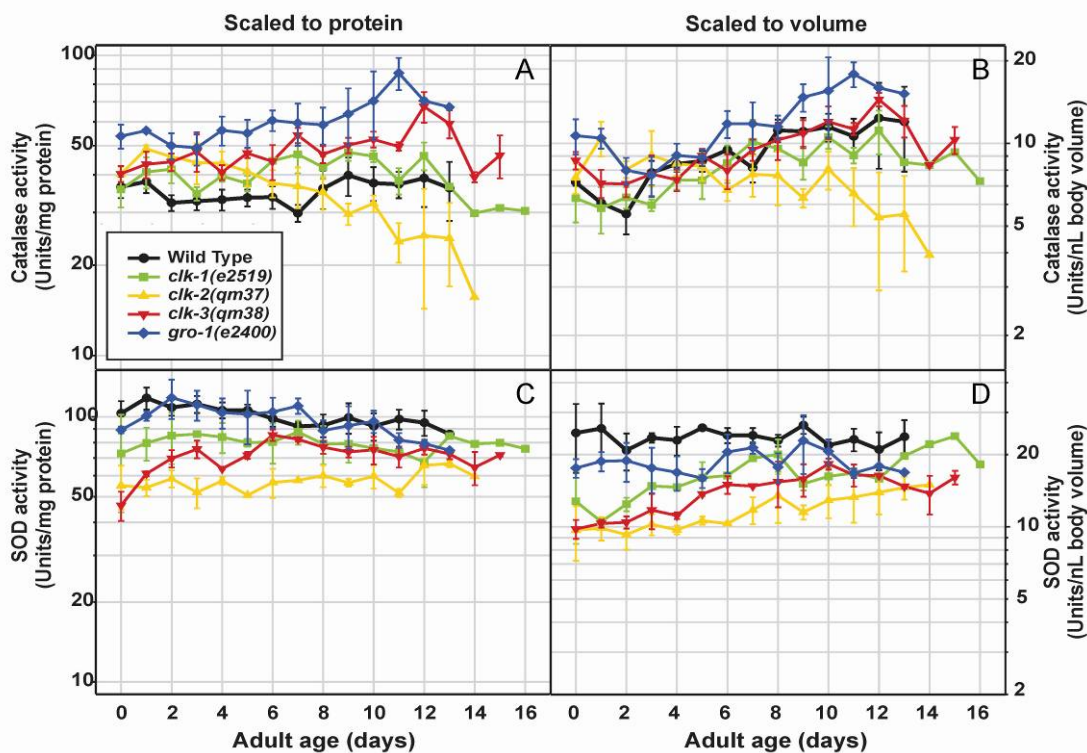


Figuur 7.33: (A) SOD activiteit van verouderende wild type wormen en insuline/IGF-1 mutanten. (B) Catalase activiteit. Gemiddelde van vier à zes replica's. De foutenvlaggen geven de standaardfout weer.

Niet enkel de antioxidatieve respons bleek gelijkaardig te zijn in de drie mutanten. Ook andere fysiologische en metabole parameters werden op dezelfde manier beïnvloed (Houthoofd *et al.*, 2005b). Er kan dus geconcludeerd worden dat de verlengde levensduur en verhoogde stressresistentie in de drie bestudeerde mutanten een gevolg zijn van een verminderde insuline/IGF-1 signalisatie via PI-3-kinase.

7.6.2.3.3 *Clk* mutanten

Een mutatie in één van de vier clock genen (*clk-1*, *clk-2*, *clk-3*, *gro-1*) veroorzaakt een globale vertraging van verschillende temporele processen, zoals bv. ontwikkeling, faryngeale pompbeweging, ei-afleg en voortbeweging, en een verlenging van de levensduur. Dit laatste effect zou een gevolg zijn van het trage fenotype. Er werd geredeneerd dat elke reductie van de *rate-of-living* zou leiden tot een vermindering van de oxidatieve schade. Deze hypothese werd echter ontkracht met de vaststelling dat het metabolisme van de *clk* mutanten niet lager was dan dat van wild type wormen (Braeckman *et al.*, 1999; Felkai *et al.*, 1999; Braeckman *et al.*, 2002a). Bovendien bleek de SOD en catalase activiteit van de *clk* mutanten in vele gevallen wel veranderd in vergelijking met wild type wormen, maar kon geen consistent patroon vastgesteld worden (Fig. 7.34).

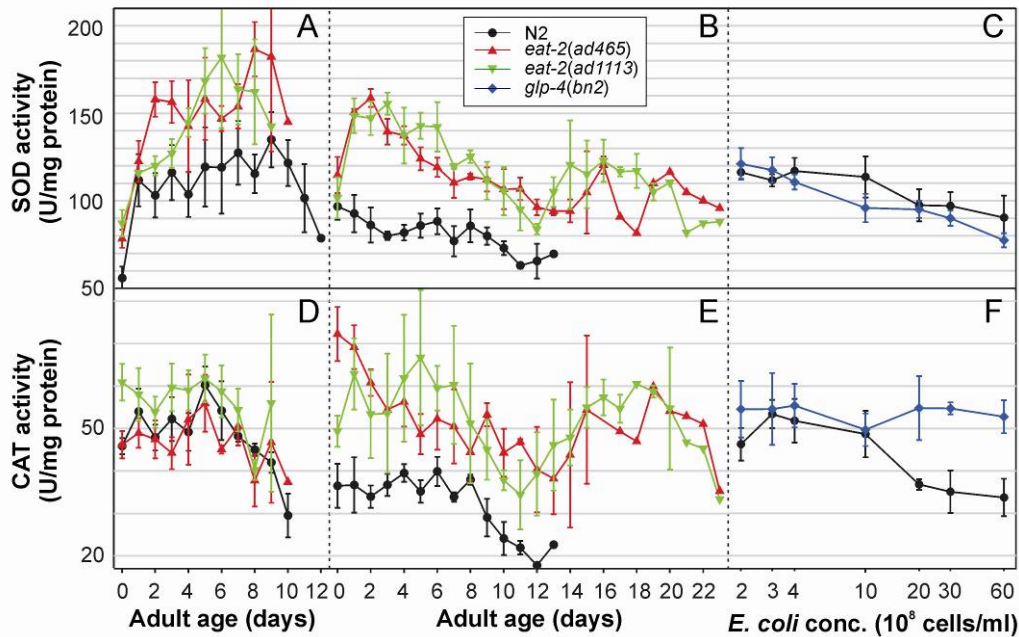


Figuur 7.34: (A,B) Catalase activiteit van verouderende wild type wormen en vier *Clk* mutanten. (C,D) SOD activiteit. De gegevens werden zowel ten opzichte van het eiwitgehalte (A,C) als ten opzichte van het volume (B,D) genormaliseerd. Gemiddelde van drie à zes onafhankelijke experimenten. De foutenvlaggen geven de standaardfout weer.

De catalase activiteit, genormaliseerd t.o.v. eiwitgehalte, was gewoonlijk verhoogd in de *clk* mutanten in vergelijking met N2 (Fig. 7.34A) ($p < 0.001$ voor de vergelijking tussen N2 en *clk-1*, *clk-3* en *gro-1*, *two-way* ANOVA). De SOD activiteit daarentegen was lager ($p < 0.001$ voor de vergelijking tussen N2 en *clk-1*, *clk-2* en *clk-3*, *two-way* ANOVA), ofwel gelijkaardig (*gro-1*) ten opzichte van wild type wormen (Fig. 7.34C). Enkel de catalase activiteit van *clk-2* vertoonde een daling in functie van de leeftijd. Indien genormaliseerd werd t.o.v. wormvolumes waren er geen grote verschillen in catalase activiteit tussen de verschillende stammen (Fig. 7.34B). De catalase activiteit was significant, maar slechts zeer beperkt hoger in *gro-1* en nam gradueel toe met stijgende leeftijd, behalve in de *clk-2* mutant. De SOD activiteit was lager in alle *clk* mutanten in vergelijking met wild type wormen, indien genormaliseerd werd t.o.v. het volume (Fig. 7.34D) ($p < 0.001$ voor alle vergelijkingen t.o.v. N2).

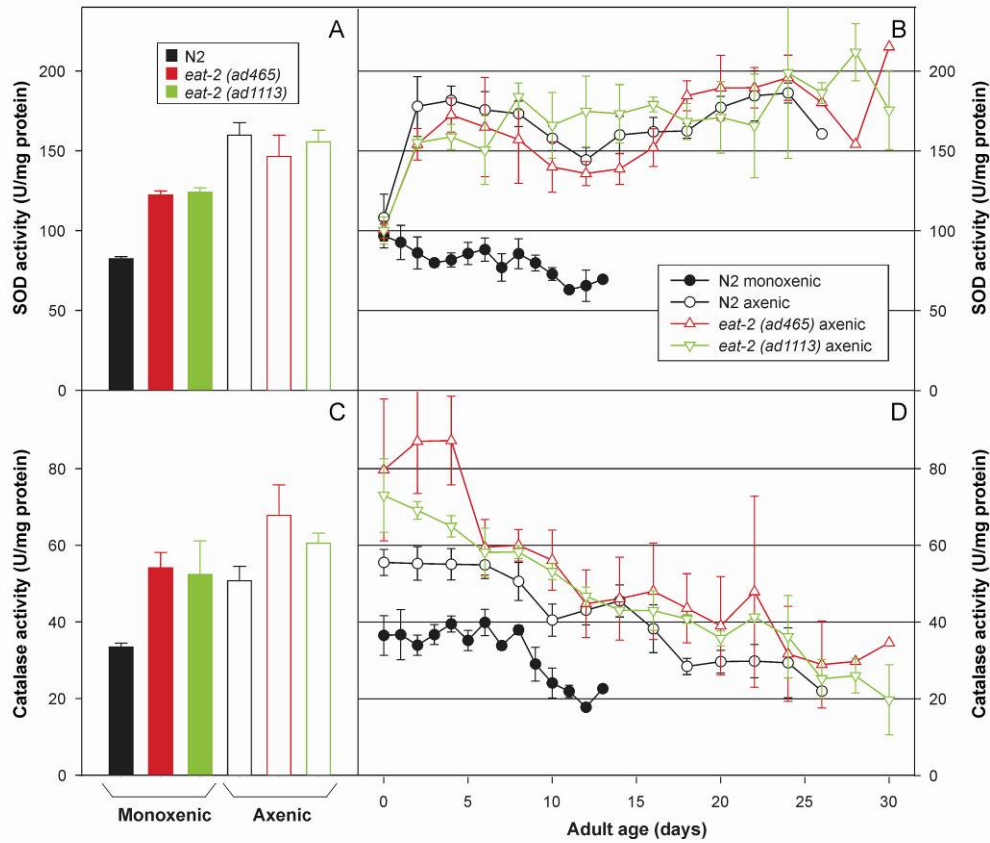
7.6.2.3.4 Calorisch gerestricteerde wormen

Voedselrestrictie wordt in *C. elegans* traditioneel op verschillende manieren bestudeerd (Klass, 1977; Lakowski en Hekimi, 1998; Vanfleteren en Braeckman, 1999). Om na te gaan of de activiteit van de antioxidatieve enzymen veranderd is in gerestricteerde wormen, werd *C. elegans* in een eerste benadering onderworpen aan CR door enerzijds wild type wormen (N2) op te groeien in vloeibare cultuur met een gereduceerde hoeveelheid bacteriën, en anderzijds door het gebruik van *eat-2* mutanten die een defecte voedselopname hebben. De *glp-4(bn2)* mutant werd in parallel onderzocht, om potentiële effecten van de productie van eieren op de respons op CR na te gaan. Op agarplaten hadden beide *eat-2* mutanten een hogere SOD activiteit in vergelijking met N2 (Fig. 7.35A) ($p < 0.001$ voor beide vergelijkingen, *two-way* ANOVA). De SOD activiteit was ook hoger voor wild type wormen op agarplaten in vergelijking met wormen in vloeibare monoxenische cultuur (Fig. 7.35A en B) ($p < 0.001$, *two-way* ANOVA). Bovendien daalde de SOD activiteit lichtjes met toenemende *E. coli* concentratie in vloeibare cultuur (Fig. 7.35C) ($p = 0.007$ voor N2 en $p < 0.001$ voor *glp-4*, lineaire regressie). De SOD-specifieke activiteit van *eat-2(ad465)* en *eat-2(ad1113)* was respectievelijk 40 en 44% hoger dan deze van N2 in vloeibare cultuur en deze verschillen werden geobserveerd over de ganse levensduur (Fig. 7.35B) ($p < 0.001$ voor beide *eat-2* allelen, *two-way* ANOVA). De catalase activiteit in vloeibare cultuur was in beide *eat-2* mutanten hoger in vergelijking met wild type wormen (Fig. 7.35E) ($p = 0.013$ voor de vergelijking tussen N2 en *eat-2(ad465)*, $p = 0.047$ voor de vergelijking tussen N2 en *eat-2(ad1113)*, *two-way* ANOVA). Hoewel de catalase activiteit in wild type wormen daalde in functie van een stijgende *E. coli* concentratie (Fig. 7.35F) ($p = 0.001$, lineaire regressie), werd deze trend niet waargenomen bij *glp-4* ($p = 0.874$).



Figuur 7.35: Activiteit van antioxidatieve enzymen in respons op voedselrestrictie door een *eat* mutatie of door verdunning van de bacteriële voedselbron in buffer. Linker luiken: Effect van *eat* mutatie op agarplaten. Middellste luiken: Effect van *eat* mutatie in vloeibare cultuur (S-buffer met 3×10^9 bact/ml). Rechter luiken: twee-dagen-oude adulte wormen in vloeibare cultuur met toenemende *E. coli* concentratie. (A,B,C) SOD activiteit. (D,E,F) Catalase activiteit. Gemiddelde van drie of vier onafhankelijke experimenten. De foutenvlaggen geven de standaardfout weer.

In een tweede benadering werd nagegaan of het onderwerpen van *C. elegans* aan calorische restrictie door kweek in axenisch medium een verandering in de antioxidatieve capaciteit teweegbrengt. Twee *eat-2* mutanten werden in parallel met wild type wormen opgegroeid om mogelijke synergistische interacties tussen axenisch medium en voedselrestrictie tengevolge van een *eat* mutatie na te gaan. Onder monoxenische condities hadden de *eat-2* mutanten een ongeveer 50% hogere SOD activiteit, beschouwd over de eerste 13 dagen van de adulte levensduur, in vergelijking met wild type wormen (Fig. 7.36A). In axenische cultuur was de SOD activiteit 94% (N2), 78% (*ad465*) en 89% (*ad1113*) hoger dan in monoxenische cultuur (Fig. 7.36A). Beschouwd over de eerste 13 dagen was de catalase activiteit van *eat-2(ad465)* en (*ad1113*) in monoxenische cultuur respectievelijk 62 en 57% hoger in vergelijking met wild type wormen (Fig. 7.36C). Hoewel wild type wormen in axenisch medium een verhoging van de catalase activiteit met 51% vertoonden in vergelijking met wormen in monoxenische cultuur (Fig. 7.36C) ($p = 0.014$), werd een dergelijk additief effect niet waargenomen bij de *eat* mutanten ($p = 0.090$ voor *eat-2(ad465)*, $p = 0.297$ voor *eat-2(ad1113)*).



Figuur 7.36: Activiteit van antioxidatieve enzymen als respons op voedselrestrictie door een *eat* mutatie of door groei in axenisch medium. Linker luiken: gemiddelde enzymactiviteit over de eerste 13 dagen van de adulte levensduur. Volle balkjes: monoxenische cultuur (3×10^9 bact/ml in S-buffer), open balkjes: axenische cultuur. Rechter luiken: enzym activiteiten over de hele adulte levensduur. (A,B) SOD activiteit. (C,D) Catalase activiteit. Gemiddelde van drie à vijf onafhankelijke experimenten. De foutenvlaggen geven de standaardfout weer.

7.6.2.4 Discussie

Bovenstaande resultaten bevestigen dat een verhoogde resistentie tegen oxidatieve stress een belangrijke factor is die mogelijk bepalend is voor de verlengde levensduur van een variëteit aan langlevende wormen. Consistent met het idee dat verschillende metabole *pathways* op gelijkaardige wijze beïnvloed worden in dauers en insuline/IGF-1 mutanten (Kenyon *et al.*, 1993; Hekimi *et al.*, 2001), werd een verhoogde SOD en catalase activiteit geobserveerd in zowel dauers, als in drie verschillende insuline/IGF-1 mutanten. Bovendien werd gerapporteerd dat *sod-1*, *sod-3* en *sod-5* sterker tot expressie komen in *age-1* en *daf-2* mutanten (Honda en Honda, 1999; Yanase *et al.*, 2002; McElwee *et al.*, 2003). Ook *ctl-1* en *ctl-2* hebben een verhoogd expressiepatroon in *age-1* en *daf-2* mutanten (Yanase *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2003). De verminderde expressie van deze genen tengevolge van RNAi onderdrukte gedeeltelijk de verlengde levensduur van *daf-2* mutanten (Murphy *et al.*, 2003). Deze verhoging van de antioxidatieve capaciteit in insuline/IGF-1 *pathway* mutanten, tesamen met een verhoging van de reductiecapaciteit (Houthoofd *et al.*, 2005b) zou kunnen

wijzen op de inductie van een uitgebreid detoxificatie programma in deze mutanten, wat in overeenstemming is met recente *microarray* analyses (McElwee *et al.*, 2004; Gems en McElwee, 2005). Ook in *D. melanogaster* gaat een mutatie in de insuline/IGF-1 *pathway* gepaard met een verhoogde SOD activiteit (Clancy *et al.*, 2001; Kabil *et al.*, 2007).

Aangezien langlevende *C. elegans* mutanten een verhoogde resistentie vertonen tegen ROS, warmte of UV, en omdat velen onder hen resistent zijn tegen deze drie vormen van stress (Larsen, 1993; Vanfleteren, 1993; Lithgow *et al.*, 1995; Murakami en Johnson, 1996; Honda en Honda, 1999; Johnson *et al.*, 2001), werd verondersteld dat de verlengde levensduur tengevolge van CR ook zou kunnen gemedieerd worden door een verhoogde resistentie tegen oxidatieve stress. Zowel wild type als *glp-4* wormen vertonen inderdaad een toegenomen SOD activiteit bij lagere *E. coli* concentraties, maar enkel N2 heeft een verhoogde catalase activiteit. Hoewel de geobserveerde verschillen statistisch significant zijn, zijn ze echter klein. In tegenstelling tot de verdunning van de bacteriële voedselbron in vloeibare cultuur, hebben beide bestudeerde *eat-2* mutanten een aanzienlijk hogere SOD en catalase activiteit. Dit impliceert dat de respons op beide methoden voor CR gelijkaardig, maar niet identiek is. Eveneens in overeenstemming met de verwachtingen is de verhoogde activiteit van SOD en catalase in axenisch medium. De verhoogde bescherming tegen oxidatieve stress is vermoedelijk noodzakelijk om een toename in ROS productie tengevolge van een verhoogd metabolisme te neutraliseren. Bovendien zou deze additionele bescherming een verbeterde instandhouding tijdens perioden van voedselschaarste kunnen bewerkstelligen. Een verhoging van de activiteit van antioxidatieve enzymen onder CR condities werd ook vastgesteld in ratten, maar de resultaten zijn blijkbaar weefsel specifiek (Feuers *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1990). In tegenstelling tot de vaststellingen in *C. elegans*, gaat CR in *D. melanogaster* niet gepaard met een verhoogde SOD activiteit (Kabil *et al.*, 2007).

Bovenstaande resultaten zijn grotendeels in overeenstemming met de vrije-radicaaltheorie die veronderstelt dat oxidatieve stress de oorzaak is van veroudering (Harman, 1956) (zie ook Hoofdstuk 3.2.1). Het is dan ook aanlokkelijk om te veronderstellen dat de verhoogde activiteit van de antioxidatieve enzymen voldoende is om een verlengde levensduur te veroorzaken. In de *clk* mutanten bleek de SOD en catalase activiteit echter niet consistent verhoogd ten opzichte van wild type wormen. Bijgevolg is de verlengde levensduur in deze mutanten geen gevolg van een verhoogde bescherming tegen oxidatieve stress. De overexpressie van SOD en/of catalase werd in *C. elegans* nog niet uitgevoerd, maar geeft in *D. melanogaster* alvast aanleiding tot dubbelzinnige resultaten (Parkes *et al.*, 1998; Sun en Tower, 1999; Sun *et al.*, 2002; Orr *et al.*, 2003). Ook transgene muizen die verschillende antioxidatieve enzymen overexpresseren hebben geen verlengde levensduur (Huang *et al.*, 2000; Schriener *et al.*, 2000; McClung *et al.*, 2004). In *C. elegans* werd de vrije-radicaaltheorie getest door toediening van synthetische antioxidantia met *in vivo* SOD en catalase activiteit. Hoewel aanvankelijk gerapporteerd werd dat deze *mimetics* de levensduur van *C. elegans* konden verlengen (Melov *et al.*, 2000), kon dit niet in andere laboratoria bevestigd worden (Keany en Gems, 2003; Keany *et al.*, 2004). Dus, het is niet bewezen dat oxidatieve stress de primaire oorzaak van veroudering is.

8 Samenvatting

Veroudering is een progressief en degeneratief proces dat leidt tot een verminderde fysieke capaciteit en een toenemende kwetsbaarheid van een organisme, met uiteindelijk de dood tot gevolg. Een populaire theorie die de oorzaak van veroudering tracht te verklaren is de vrije-radicaaltheorie. De essentie van deze hypothese is dat endogeen geproduceerde reactieve zuurstofradicalen aan de basis liggen van het verouderingsproces door cumulatieve schade te veroorzaken aan DNA, lipiden en eiwitten. Vooral het mitochondriale elektronentransport draagt in belangrijke mate bij aan dit proces van oxidatieve beschadiging.

Tal van eenvoudige modelorganismen zoals de gist *S. cerevisiae*, de schimmel *P. anserina*, de nematode *C. elegans*, de fruitvlieg *D. melanogaster* en knaagdieren, worden gebruikt in het onderzoek naar veroudering. De studie van het verouderingsproces in deze organismen kende de voorbije decennia een hoge vlucht met de identificatie van een brede waaier aan langlevende mutanten. Vervolgens werden verschillende evolutief geconserveerde mechanismen van veroudering in deze modelsystemen geïdentificeerd, wat hun relevantie voor het onderzoek naar veroudering in de mens benadrukt. Zo blijken de insuline/IGF-1 *pathway*, sirtuïnes en TOR signalisatie publieke mechanismen van veroudering te zijn. Ook de mitochondriën spelen een belangrijke rol in het verouderingsproces.

Calorische restrictie (CR), de minimale opname van voedsel, zonder ondervoeding, is tot op heden de enige interventie die de ontwikkeling van ouderdomsgerelateerde ziekten vertraagt en een robuuste verlenging van de levensduur veroorzaakt in een brede waaier aan organismen, waaronder zoogdieren. Gezien de meervoudige effecten van een gereduceerde voedselopname, is het mechanisme dat aan de basis ligt van de levensduurverlenging tengevolge van CR echter nog steeds onderwerp van discussie.

In dit doctoraat werden verschillende aspecten van veroudering en CR onderzocht in de nematode *C. elegans*. De snelle levenscyclus, korte levensduur, goedkope kweekmethoden (*C. elegans* wordt gekweekt op agarplaten met een laagje *E. coli*) en het volledig gesequeneerd genoom zijn slechts enkele van de vele voordelen die dit organisme te bieden heeft. Ondanks het feit dat *C. elegans* erg in trek is als modelsysteem voor veroudering, werd in deze nematode, in vergelijking met andere modelorganismen, verrassend weinig onderzoek verricht naar CR. *C. elegans* wordt op verschillende manieren onderworpen aan CR: door verdunning van de bacteriële voedselbron in buffer of op agarplaten, door gebruik te maken van *eat* mutanten die zich niet normaal kunnen voeden en door groei in axenische cultuur. De resultaten bekomen met deze methoden zijn nogal variabel en onderling soms moeilijk vergelijkbaar, wat de studie van de onderliggende mechanismen bemoeilijkt. Eén van de doelstellingen van dit doctoraat was dan ook de optimalisatie van een nieuwe methode voor CR in *C. elegans*. Ook werd een reeds gevestigde methode (het gebruik van *eat* mutanten met defecten in de voedselopname) uitgebreid geëvalueerd. Vervolgens werd nagegaan of CR in *C. elegans* een echte vertraging van het verouderingsproces veroorzaakt. Er werd ook bestudeerd waarom de respons van wormen

op de afwezigheid van de bacteriële voedselbron verschillend is op agarplaten en in vloeibare cultuur. In een volgende paragraaf werd onderzocht of er in een populatie die slechts in beperkte mate met sterfte af te rekenen heeft reeds metabole en fysiologische veranderingen optreden die wijzen op veroudering. Tenslotte werd ook een verbeterde methode op punt gesteld voor de bepaling van de superoxidedismutase (SOD) activiteit. Deze methode werd gebruikt voor het bestuderen van de SOD activiteit onder condities van CR en in een aantal langlevende mutanten.

De nieuwe methoden voor CR die in dit werk ontwikkeld werden, maken gebruik van axenisch medium in agarplaten. Wormen die op deze nutriënt-rijke axenische platen gegroeid werden in afwezigheid van bacteriën als voedselbron leefden aanzienlijk langer dan goed gevoede dieren. Door verschillende hoeveelheden groei-geïnhibeerde *E. coli* cellen aan de axenische platen toe te voegen kan de sterkte van het CR effect bovendien gevarieerd worden. Een hoge concentratie groei-geïnhibeerde bacteriën onderdrukte volledig de verlengde levensduur van *C. elegans* op agarplaten met axenisch medium. Dit impliceert dat *E. coli* een specifieke component bevat die afwezig is in axenisch medium en die noodzakelijk is voor de levensduur bij maximale *fitness*.

Vervolgens werden deze nieuwe methoden gebruikt om de mechanistische basis van CR in axenisch medium te ontrafelen. Gezien de rijke samenstelling van dit medium is een verlengde levensduur namelijk niet eenvoudig te verklaren. Er zijn dan ook meerdere mechanismen die de levensduur van *C. elegans* zouden kunnen verlengen in axenisch medium. Zo draagt de afwezigheid van bacteriële infecties zeker bij aan de verlengde levensduur in axenische cultuur. Een andere mogelijkheid is dat axenisch medium deficiënt is in één van de grote klassen van voedingsstoffen (bv. carbohydraten of proteïnen). De nutriëntanalyse van het axenisch medium spreekt dit echter tegen. Ook het variëren van de concentratie aan axenisch medium had slechts een beperkte invloed op de levensduur. Experimenten waarin *C. elegans* gegroeid werd op *E. coli* cellen met een verschillende mate van metabole activiteit suggereren echter de geheel nieuwe conclusie dat metabool actieve bacteriën een noodzakelijk onderdeel van de voeding zijn voor de nematoden en dat hun afwezigheid in axenische cultuur leidt tot een streng CR regime. Hoe levende *E. coli* zou kunnen bijdragen aan de voeding van *C. elegans* is echter niet gekend. Bovendien blijven alternatieve interpretaties mogelijk. Zo is het bv. niet uitgesloten dat één of meer labiele bestanddelen die geassocieerd zijn met de hoog molecuulair gewicht-fractie van een *E. coli* extract, van belang zijn voor de voeding van de nematoden. Anderzijds suggereerden vroege studies dat de opname van nutriënten gestimuleerd wordt door de aanwezigheid van partikels in het kweekmedium. Deze beïnvloeden enerzijds de slikfrequentie van de nematoden. Anderzijds bevorderen subcellulaire partikels de opname van voedingsstoffen door de darmcellen. Axenisch medium bevat echter geen particulier materiaal. De waarneming dat verschillende plantenextracten de effecten van axenische cultuur slechts in beperkte mate konden onderdrukken, zou kunnen betekenen dat *C. elegans* inderdaad een voedselsupplement nodig heeft dat bestaat uit partikels. Leverextract, dat een eiwitprecipitaat vormt van variabele grootte, kon de vertraagde ontwikkeling en verlengde levensduur in axenisch medium gedeeltelijk onderdrukken, wat een gevolg zou kunnen zijn van zijn particuliere aard.

eat mutanten vertonen neuronale en musculaire defecten die interfereren met de werking van de farynx, wat leidt tot een vertraagde ontwikkeling en een verhongerd uiterlijk. Sinds de vaststelling dat een aantal van deze mutanten langer leven, worden ze algemeen aanvaard als model voor CR. De resultaten met *eat* mutanten verschillen echter sterk van labo tot labo, wat de vraag doet rijzen of het gebruik van alternatieve methoden niet aangewezen is. Een mogelijke verklaring is dat deze mutanten gerestricteerd zijn afhankelijk van de omgevingscondities, zoals de dikte van de laag bacteriën op de agarplaten. Deze hypothese werd onderzocht door de levensduur van *eat-1(ad427)*, *eat-2(ad1116)* en *eat-6(ad467)* te bepalen in aanwezigheid van verschillende concentraties groei-geïnhibeerde *E. coli*. De resultaten tonen aan dat de levensduur van de verschillende *eat* mutanten sterk conditie-afhankelijk is. Enkel onder standaard kweekcondities (NGM platen met prolifererende *E. coli* OP50) werd een duidelijke verlenging van de levensduur geobserveerd t.o.v. wild type wormen. In aanwezigheid van verschillende concentraties groei-geïnhibeerde bacteriën leefde geen enkele *eat* mutant langer dan wild type wormen. Er kon dus geen verband vastgesteld worden tussen de dikte van de laag bacteriën op de agarplaten en de levensduur. Ook indien een alternatieve *E. coli* stam gebruikt werd, werd geen verlenging van de levensduur geobserveerd. Bijgevolg kunnen *eat* mutanten slechts met de grootst mogelijke voorzichtigheid gebruikt worden voor onderzoek naar CR in *C. elegans*.

De Gompertz-vergelijking beschrijft de exponentiële toename van de *mortality rate* in functie van de leeftijd. Recent onderzoek in fruitvliegen en knaagdieren maakte gebruik van dit model om het biodemografische mechanisme te bestuderen dat aan de basis ligt van de respons op CR. In principe zou CR de levensduur kunnen beïnvloeden door het onmiddellijke risico op sterven te verminderen, door het verouderingsproces te vertragen, of door een combinatie van beide. Gebruik makend van de axenische plaatmethode voor CR werd in deze studie aangetoond dat CR de levensduur in *C. elegans* verlengt door een echte vertraging van het verouderingsproces, in tegenstelling met *Drosophila* waar CR het acute risico op sterfte vermindert. Verder werd aangetoond dat de effecten van CR zich voornamelijk manifesteren tijdens de vroege fasen van het adulte stadium. Tenslotte bleek de biodemografische respons op een verminderde voeding verzwakt in oude wormen ten opzichte van jonge dieren. De respons van *C. elegans* op CR komt overeen met deze van ratten, maar is in strijd met observaties in *D. melanogaster* en muizen. Dit impliceert dat, hoewel de verlenging van de levensduur door CR wijdverspreid is in het dierenrijk, de onderliggende biologische mechanismen grotendeels species-specifiek blijken te zijn.

Zeer recent werd aangetoond dat de volledige verwijdering van de bacteriële voedselbron tijdens het adulte stadium van *C. elegans* een aanzienlijke verlenging van de levensduur tot gevolg had op agarplaten. Deze levensduurverlenging bleek onafhankelijk te zijn van de transcriptiefactor DAF-16. Dit is in strijd met andere rapporten die een verkorting van de levensduur observeerden wanneer de bacteriële voedselbron sterk verdund werd in buffer en die de betrokkenheid van DAF-16 vaststelden. Een mogelijke verklaring voor deze tegenstrijdige resultaten is dat de nematoden de afwezigheid van *E. coli* op agarplaten niet herkennen als verhongering. In tegenstelling tot vloeibare cultuur, bevatten agarplaten 0.25% pepton. In het kader van dit doctoraat werd onderzocht of deze pepton het verschil

tussen CR en verhogering kan verklaren. Onze resultaten tonen aan dat dit niet het geval is. Dit suggereert dat de wormen mogelijk voedingsstoffen kunnen bekomen uit agar, dat een galactosepolymeer is. Een alternatieve verklaring is dat kweek in vloeibare cultuur stresserend is voor de nematoden, met een kortere levensduur tot gevolg.

Veroudering gaat in *C. elegans* gepaard met een hele reeks metabole en fysiologische veranderingen. In dit doctoraat werd nagegaan of een aantal van deze veranderingen zich reeds manifesteren in jonge wormpopulaties met een overlevingsgraad van minstens 80%. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Zo was de opstapeling van beschadigde eiwitten, gemeten via de geaccumuleerde lipofuscines en geoxideerde flavinecofactoren, waarneembaar vanaf de laatste vervelling tot het adulte stadium. Ook de metabole capaciteit, gemeten als de lichtproductiepotentiaal, nam gradueel af in het onderzochte tijdsinterval. Dit had echter initieel geen gevolgen voor de ATP-concentratie. De activiteit van aconitase, een Krebscyclusenzym dat zeer gevoelig is aan oxidatieve beschadiging, vertoonde slechts een beperkte achteruitgang in jonge wormen.

Superoxidedismutase (SOD), dat de omzetting van superoxide tot waterstofperoxide katalyseert, is één van de sleutelcomponenten in de cellulaire defensie tegen mitochondriaal geproduceerde ROS. Er bestaan verschillende methoden voor de bepaling van de SOD activiteit. Eén van de meest gebruikte methoden bleek echter weinig gevoelig en arbeidsintensief te zijn. Bovendien mislukten onze pogingen om deze techniek aan te passen voor gebruik in een 96-well formaat. In deze studie werd daarom een zeer gevoelige methode, gebaseerd op chemiluminescentie, geoptimaliseerd en aangepast voor gebruik in een microtiterplaat, waardoor nu zes verschillende stalen gelijktijdig kunnen gemeten worden met verbruik van aanzienlijk minder biologisch materiaal. Vervolgens werd deze *assay* gebruikt voor het bepalen van de totale SOD activiteit in langlevende wormen. In parallel werd ook de catalase activiteit gemeten. De resultaten bevestigen dat een verhoogde resistentie tegen oxidatieve stress een belangrijke factor is die mogelijk bepalend is voor de verlengde levensduur van de onderzochte wormen. De SOD en catalase activiteiten bleken namelijk verhoogd in dauers (een langlevend diapause stadium dat *C. elegans* in staat stelt om ongunstige omgevingscondities te overleven), in drie insuline/IGF-1 mutanten en in wormen die op verschillende manieren onderworpen werden aan calorische restrictie. Hoewel dit in overeenstemming is met de vrije-radicaaltheorie, kon in vier langlevende *clk* mutanten, die een globale vertraging vertonen van verschillende temporele processen, geen consistente verhoging van de SOD en catalase activiteit vastgesteld worden. Bovendien werd eerder gerapporteerd dat in fruitvliegen en muizen, na manipulatie van de expressieniveaus van verschillende antioxidatieve enzymen, geen verband kon vastgesteld worden tussen de enzymactiviteiten en de levensduur. Bijgevolg is het nog steeds niet afdoende bewezen dat oxidatieve stress de primaire oorzaak van veroudering is.

9 Synopsis en toekomstplannen

Zoals werd aangetoond in de inleidende hoofdstukken, zijn er diverse gelijkaardige signaaltransductiepaden die het verouderingsproces sturen in evolutief ver verwijderde organismen. Ook de verlenging van de levensduur door CR is evolutief geconserveerd in zeer verschillende organismen zoals gist, invertebraten en zoogdieren. Dit suggereert dat de mechanismen die aan de basis liggen van de levensduurverlenging tengevolge van CR ook geconserveerd zijn. Verschillende signaaltransductiepaden kunnen echter aan de basis liggen van het CR effect in verschillende organismen. Net zoals het mogelijk is dat verschillende methoden voor CR binnen één organisme de levensduur zou kunnen verlengen via verschillende mechanismen (Piper en Partridge, 2007). De vaststelling dat de respons op drie verschillende methoden voor CR in *C. elegans* een gelijkaardig, maar niet identiek effect had op de stressrespons en het metabolisme, ondersteunt deze hypothese. Aangezien het mechanisme van CR nog onbekend is, blijft ook deze kwestie echter onopgehelderd (Piper en Partridge, 2007). In de literatuur zijn er verschillende rapporten te vinden die inderdaad wijzen op species-specifieke mechanismen van levensduurverlenging onder condities van CR (zie Hoofdstuk 5). Zo blijkt de insuline/IGF-1 *pathway* een rol te spelen in de respons op CR in *S. cerevisiae* en *D. melanogaster*, maar niet in *C. elegans*. Voorlopig werd enkel in fruitvliegen ondubbelzinnig aangetoond dat sirtuïnes betrokken zijn bij de respons op CR. De betrokkenheid van de TOR *pathway* werd dan weer aangetoond in *S. cerevisiae* en *C. elegans*, maar bewijs ontbreekt nog voor *D. melanogaster* en zoogdieren. Ook onze eigen resultaten wijzen op soort-specifieke mechanismen van levensduurverlenging onder CR condities. Zo is er de potentiële noodzaak voor metabool actieve bacteriën als voedselbron voor *C. elegans* en de waarneming dat de demografische respons op CR in *C. elegans* verschillend is van deze van sommige andere organismen.

Wat betreft de metabole activiteit van de bacteriële voedingsbron, suggereren onze resultaten dat CR in *C. elegans* tengevolge van groei op axenisch medium in agarplaten verschillend is van CR methoden in andere modelorganismen. In *Drosophila* werd bv. aangetoond dat axenische kweek geen invloed had op de levensduur (Ren *et al.*, 2007). Er zijn echter observaties die suggereren dat de mechanismen die aan de basis liggen van de levensduurverlenging tengevolge van CR misschien toch niet zo verschillend zijn tussen wormen en zoogdieren. Zo zijn kiemvrije en CR knaagdieren beide langlevend, maar werden geen additieve effecten op de levensduur vastgesteld wanneer kiemvrije muizen onderworpen werden aan CR (Shimizu *et al.*, 1998). Ook nam de reproductieve capaciteit van kiemvrije dieren toe na contaminatie met darmbacteriën, wat ook geobserveerd wordt in *C. elegans* na toevoegen van bestraalde *E. coli* aan axenisch medium in agarplaten.

De demografische respons op CR is gelijk in *C. elegans* en ratten, maar verschilt van deze van fruitvliegen en muizen. Recent werd door Masoro (2006) de hypothese naar voor geschoven dat CR de levensduur zou kunnen verlengen door zowel de vorming van schadelijke producten te reduceren en, omdat het een lage-intensiteitsstressor is, door aanleiding te geven tot hormesis en defensiemechanismen tegen stress te induceren die ook beschermen tegen veroudering. Hij suggereert dat de mate waarin elk van beide

mechanismen betrokken is bij de respons op CR verschilt tussen verschillende soorten. Zo wordt voorspeld dat in dieren die op CR reageren zoals ratten en *C. elegans* (verandering van de G parameter) beide mechanismen betrokken zijn, terwijl in dieren die een respons vertonen die gelijkaardig is aan deze van *D. melanogaster* (verandering van $\ln(A)$) voornamelijk het tweede mechanisme (hormesis) van belang is. Dus, het CR effect zou in verschillende organismen kunnen veroorzaakt worden door deels overlappende en deels verschillende mechanismen. Hoewel Masoro's hypothese een interessant uitgangspunt vormt voor verder onderzoek naar de manier waarop CR het verouderingsproces beïnvloedt, vereist het wel eerst een verbeterde kennis van het verouderingsproces zelf. Zo staat het nog niet vast dat bv. ROS de oorzaak zijn van veroudering en ook de mechanistische basis van hormesis zelf is nog niet helemaal duidelijk.

Ondanks het feit dat het mechanisme van CR al meer dan 70 jaar bestudeerd wordt, blijft het onderliggende mechanisme van levensduurverlenging voorlopig dus onbekend. Hoewel het fenomeen van CR in oorsprong voornamelijk onderzocht werd in knaagdieren, zijn grootschalige overlevingsexperimenten toch handiger met kortlevende en makkelijk te kweken modelorganismen zoals de invertebraten (Piper en Partridge, 2007). Om echter relevant te zijn voor de studie van veroudering in hogere organismen, is het belangrijk om publieke of evolutionair geconserveerde mechanismen te identificeren. Hoewel gegevens uit de literatuur soort-specifieke mechanismen suggereren, zijn gemeenschappelijke effectoren van het CR effect toch niet uitgesloten. Een potentieel universeel kandidaat-mechanisme voor de verlenging van de levensduur als respons op de beschikbaarheid van voedsel is de activering van autofagie (via TOR signalisatie?). Het proces van autofagie is, net als CR, ook evolutief geconserveerd en heeft als doel het verwijderen en afbreken van beschadigde cytosolische eiwitten en organellen. Het afgebroken materiaal wordt nadien weer vrijgesteld in het cytoplasma, waar het opnieuw kan gebruikt worden door de cel. Autofagie wordt dan ook geactiveerd bij verhongering in tal van organismen (Droge, 2004; Scott *et al.*, 2004). In een zeer recente studie met ratten werd aangetoond dat een stijgende leeftijd geen verminderde autofagie tot gevolg had. CR condities gingen echter wel gepaard met een verhoogde activiteit van dit proces in het hart (Wohlgemuth *et al.*, 2007).

In *C. elegans* werd aangetoond dat autofagie noodzakelijk is voor de verlengde levensduur van *daf-2* mutanten (Melendez *et al.*, 2003; Hars *et al.*, 2007). Bovendien werd in verschillende mutanten met gereduceerde voedselopname, waaronder enkele *eat* mutanten, een verhoogde autofagie vastgesteld (Mörck en Pilon, 2006). Er werd gesuggereerd dat de verhoogde activiteit van dit proces in deze mutanten de cellen zuivert van beschadigde en slecht functionerende proteïnen en organellen die anders zouden kunnen leiden tot de accumulatie van moleculaire schade (Cuervo *et al.*, 2005; Mörck en Pilon, 2007). Ook de inhibitie van het *C. elegans* TOR gen gaat gepaard met een verlengde levensduur (Vellai *et al.*, 2003) en van dit eiwit is geweten dat het autofagie negatief reguleert (Wullschleger *et al.*, 2006). In een zeer recente studie werd bovendien aangetoond dat twee essentiële autofagie-genen noodzakelijk zijn voor de verlengde levensduur van een *eat-2* mutant (Jia en Levine, 2007). Deze waarnemingen benadrukken het belang van de verdere studie van CR in *C. elegans*, met uitzicht op nieuwe inzichten in de respons op CR. Ook de recente ontdekking van transcriptiefactoren die de respons van *C. elegans* op CR

volledig kunnen blokkeren (Bishop en Guarente, 2007; Panowski *et al.*, 2007) en onze eigen vaststelling dat metabool actieve *E. coli* cellen een noodzakelijk onderdeel van de voeding zouden kunnen zijn, openen alvast nieuwe en boeiende wegen voor verder onderzoek naar CR in deze nematode.

10 Bijlagen

10.1 Overzicht van wiskundige modellen voor de studie van verouderende populaties

Zoals aangegeven in Hoofdstuk 2 bestaan er verschillende wiskundige modellen die het verband tussen *mortality rate* en de leeftijd beschrijven. Deze modellen verschillen van elkaar in de manier waarop de snelheid van sterven toeneemt met stijgende leeftijd. Het Gompertz-model veronderstelt dat de *mortality rate* onveranderd exponentieel toeneemt in functie van de leeftijd. De snelheid waarmee dit gebeurt, wordt bepaald door de species-specifieke snelheid van verouderen (Finch, 1990; Johnson, 1990). In het Weibull model vertraagt de *mortality rate* op hogere leeftijd (Vanfleteren *et al.*, 1998; Ricklefs en Scheuerlein, 2002). In het twee-parametrische logistische model zal de *mortality rate* eerst stijgen, maar op hogere leeftijd weer dalen (Vanfleteren *et al.*, 1998). Tabel 10.1 geeft voor elk model de leeftijds-specifieke *mortality rate*, de overeenkomstige overlevingsfunctie en de betekenis van de parameters weer. In figuur 10.1 wordt geïllustreerd wat de impact is van een verandering in één parameter op de vorm van de curve, wanneer de andere parameter constant gehouden wordt.

Model	<i>Mortality rate</i>	% Survival	parameters
Gompertz	Ae^{Gt}	$100 \exp [-(A/G)(1-e^{-Gt})]$	A = initiële <i>mortality rate</i> G = maat voor verouderingssnelheid
Weibull	$(a/b^a)t^{a-1}$	$100 \exp [-(t/b)^a]$	a = maat voor populatieheterogeniteit b = gemiddelde levensduur
2p-logistisch	$(bt^{b-1})/(c^b + t^b)$	$100/[1 + (t/c)^b]$	b = maat voor populatieheterogeniteit c = gemiddelde levensduur

Tabel 10.1: Overzicht van enkele wiskundige modellen die de leeftijds-specifieke sterfte (*mortality rate*) in functie van de leeftijd weergeven.

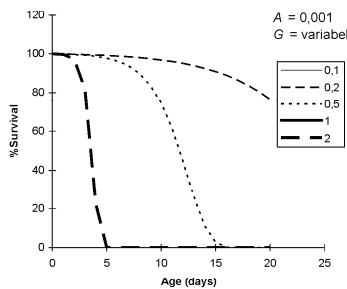
Om na te gaan door welk model de data het best gefit worden, zijn grote populaties nodig (Wilson, 1993). Bovendien werd aangetoond dat in sommige gevallen de gegevens van mannetjes en vrouwtjes het best gefit worden door verschillende functies. Dit suggereert dat wanneer het effect van een genetische manipulatie of een interventie in de omgevingsfactoren op de levensduur getest wordt, men best nagaat of het '*best-fit*' model voor en na de interventie nog dezelfde is (Wilson, 1994).

Of deze wiskundige modellen ook biologische implicaties hebben en of ze een accurate weergave zijn van de werkelijkheid, is al jaren onderwerp van discussie (Finch, 1990; Kowald, 2002; Driver, 2003; Fox en Moya-Laraño, 2003). Bovendien geven verschillende onderzoeksgroepen vaak een eigen interpretatie aan de modellen. Zo werd de Weibull-

functie bijvoorbeeld initieel ontwikkeld om het falen van machines te modelleren (Braeckman *et al.*, 1998). Typisch aan de veroudering van machines is dat de levensduur bepaald wordt door een stochastisch proces. Hoe complexer een machine, hoe groter de kans bovendien is dat er een onderdeel zal kapotgaan. Ricklefs en Scheuerlein (2002) gaven echter een heel andere interpretatie aan dit model. De afvlakking van de *mortality rate* op hogere leeftijd impliceert volgens hen verschillende en additieve doodsoorzaken bij jonge en oudere individuen. In tegenstelling hiermee zou in het Gompertz-model de doodsoorzaak van oudere individuen identiek zijn aan deze van jonge individuen. De oudere individuen zouden echter steeds minder bestand tegen deze doodsoorzaken. Het grote verschil tussen de Gompertz- en Weibull-functies is dat het Gompertz-model afgeleid werd uit overlevingstabellen (en dus experimenteel tot stand kwam), terwijl het Weibull model een theoretische basis heeft. De twee-parametrische logistische functie kan beschouwd worden als een mathematische verfijning van deze modellen: door het toevoegen van een extra term wordt een betere *fitting* verkregen.

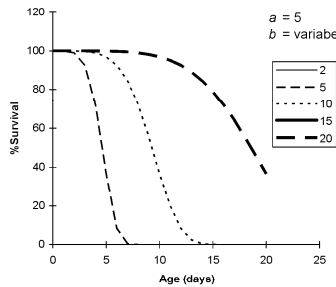
Gompertz best fit voor %Survival

$$y = 100 \times e^{(A/G)(1-e^{Gt})}$$



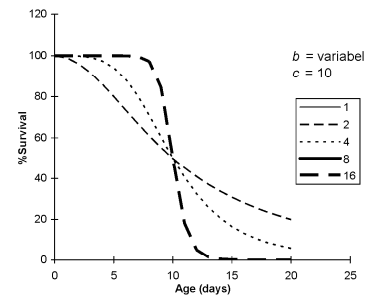
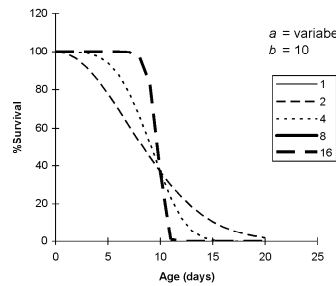
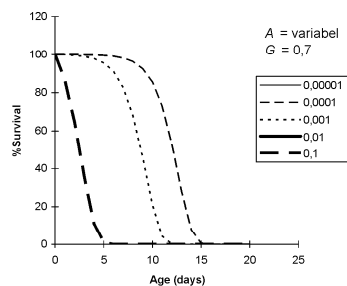
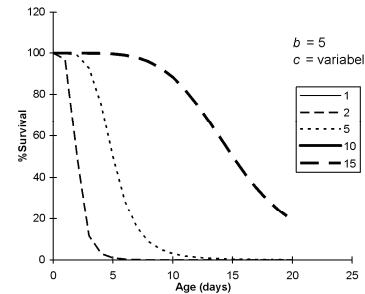
Weibull best fit voor %Survival

$$y = 100 \times e^{-(t/b)^a}$$



Logistic best fit voor %Survival

$$y = 100 / [1 + (x/c)^b]$$



Figuur 10.1: Weergave van de impact die een verandering in één van de model parameters heeft op de vorm van de overlevingscurve.

Ondanks de uiteenlopende meningen over het gebruik van het Gompertz-model, wordt deze functie toch zeer vaak gebruikt in wetenschappelijke publicaties (zie bv. Finch *et al.*, 1990; Johnson, 1990; Pugh *et al.*, 1999; Mair *et al.*, 2003; Bross *et al.*, 2005; de Magalhães *et al.*, 2005).

10.2 Lijst van publicaties

Lenaerts, I., Walker, G., Van Hoorebeke, L., Gems, D., Vanfleteren, J. (2007). Dietary restriction of *Caenorhabditis elegans* by axenic culture reflects nutritional requirement for constituents provided by metabolically active microbes. *Journals of Gerontology Ingediend voor publicatie*.

Lenaerts, I., Van Eygen, S., Vanfleteren, J. (2007). Adult-limited dietary restriction slows Gompertzian aging in *Caenorhabditis elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1100**, 442-448.

Houthoofd, K., Fidalgo, M.A., Hoogewijs, D., Braeckman, B.P., **Lenaerts, I.,** Brys, K., Matthijssens, F., De Vreese, A., Van Eygen, S., Muñoz, M.J., Vanfleteren, J. (2005). Metabolism, physiology and stress defence in three aging *Ins/IGF-1* mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **4**, 87-95.

Braeckman, B.P., Houthoofd, K., Brys, K., **Lenaerts, I.,** De Vreese, A., Van Eygen, S., Raes, H., Vanfleteren, J. (2002). No reduction of energy metabolism in *Clk* mutants. *Mechanisms of Ageing and Development* **123**, 1447-1456.

Houthoofd, K., Braeckman, B., **Lenaerts, I.,** Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J. (2002). Ageing is reversed, and metabolism is reset to young levels in recovering dauer larvae of *C. elegans*. *Experimental Gerontology* **37**, 1015-1021.

Houthoofd, K., Braeckman, B., **Lenaerts, I.,** Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J. (2002). No reduction of metabolic rate in food restricted *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* **37**, 1357-1367.

Houthoofd, K., Braeckman, B., **Lenaerts, I.,** Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J. (2002). Axenic growth up-regulates maas-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* **37**, 1369-1376.

Lenaerts, I., Braeckman, B.P., Matthijssens, F., Vanfleteren, J. (2002). A high-throughput microtiter plate assay for superoxide dismutase based on lucigenin chemiluminescence. *Analytical Biochemistry* **311**, 90-92.

Deze publicaties terug te vinden op bijgevoegde CR-ROM.

11 Referenties

Accili, D., Drago, J., Lee, E.J., Johnson, M.D., Cool, M.H., Salvatore, P., Asico, L.D., José, P.A., Taylor, S.I., Westphal, H. (1996). Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nature Genetics* **12**, 106-109.

Ackermann, M., Stearns, S.C., Jenal, U. (2003). Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science* **300**, 1920.

Adachi, H., Fujiwara, Y., Ishii, N. (1998). Effects of oxygen on protein carbonyl and aging in *Caenorhabditis elegans* mutants with long (*age-1*) and short (*mev-1*) life spans. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **53**, B240-244.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.

Ailion, M., Inoue, T., Weaver, C.I., Holdcraft, R.W., Thomas, J.H. (1999). Neurosecretory control of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7394-7.

Albert, P.S., Brown, S.J., Riddle, D.L. (1981). Sensory control of dauer larva formation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Comparative Neurology* **198**, 435-451.

Albert, P.S., Riddle, D.L. (1988). Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae. *Developmental Biology* **126**, 270-293.

Albertson, D.G., Thomson, J.N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* **275**, 299-325.

Alcedo, J., Kenyon, C. (2004). Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons. *Neuron* **41**, 45-55.

Al-Regaiey, K.A., Masternak, M.M., Bonkowski, M., Sun, L., Bartke, A. (2005). Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor I/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology* **146**, 851-860.

Altman, D. G. and Bland, J. M. (1998). Statistics notes: Time to event (survival) data. *British Medical Journal* **317**, 468-469.

An, J.H., Blackwell, T.K. (2003). Skn-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress-response. *Genes & Development* **17**, 1882-1893.

Anderson, G.L. (1982). Superoxide dismutase activity in dauerlarvae of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda, Rhabditidae). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **60**, 288-291.

Anderson, R.M., Weindruch, R. (2006). Calorie restriction: Progress during mid-2005-mid-2006. *Experimental Gerontology* **41**, 1247-1249.

Ann, K., Kowalchuk, J.A., Loyet, K.M., Martin, T.F.J. (1997). Novel Ca²⁺-binding protein (Caps) related to unc-31 required for Ca²⁺-activated exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 19637-19640.

- Anson, R.M., Hansford, R.G. (2004). Mitochondrial influence on aging rate in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 3, 29-34.
- Antebi, A. (2007). Ageing - When less is more. *Nature* 447, 536-537.
- Antebi, A., Yeh, W.H., Tait, D., Hedgecock, E.M., Riddle, D.L. (2000). Daf-12 encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. *Genes & Development* 14, 1512-1527.
- Apfeld, J., Kenyon, C. (1999). Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 402, 804-9.
- Apfeld, J., O'connor, G., McDonagh, T., Distefano, P.S., Curtis, R. (2004). The Amp-activated protein kinase *aak-2* links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes & Development* 18, 3004-3009.
- Arantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., Kenyon, C. (2002). Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 295, 502-5.
- Arking, R. (1998). In: *Biology of aging: Observations and principles*, second edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Ashrafi, K., Chang, F.Y., Watts, J.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Ruvkun, G. (2003). Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421, 268-272.
- Austad, S.N. (1993). Retarded senescence in an insular population of Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). *Journal of Zoology* 229, 695-708.
- Austad, S.N., Kristan, D.M. (2003). Are mice calorically restricted in nature? *Aging Cell* 2, 201-207.
- Avery, L. (1993). The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 133, 897-917.
- Avery, L., Horvitz H.R. (1989). Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*. *Neuron* 3, 473-485.
- Avery, L., Shtonda, B.B. (2003). Food transport in the *C. elegans* pharynx. *Journal of Experimental Biology* 206, 2441-2457.
- Avery, L., Thomas, J.H. (1997). Feeding and defecation. In: Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess J.R. (eds.) *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Avruch, J., Hara, K., Lin, Y., Liu, M., Long, X., Ortis-Vega, S., Yonezawa, K. (2006). Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 25, 6361-6372.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120, 483-495.
- Bandyopadhyay, J., Lee, J., Lee, J., Il Lee, J., Yu, J.R., Jee, C., Cho, J.H., Jung, S., Lee, M.H., Zannoni, S., Singson, A., Kim, D.H., Koo, H.S., Ahnn, J. (2002). Calcineurin, a calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, is involved in movement, fertility, egg Laying, and growth in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 13, 3281-3293.

- Barbieri, M., Bonafe, M., Franceschi, C., Paolisso, G. (2003). Insulin/Igf-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 285, E1064-E1071.
- Bargmann, C.I., Hartwig, E., Horvitz, H.R. (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74, 515-527.
- Bargmann, C.I., Thomas, J.H., Horvitz, H.R. (1990). Chemosensory cell function in the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 55, 529-538.
- Barja, G. (2002). Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Research Reviews* 1, 397-411.
- Barsyte, D., Lovejoy, D.A., Lithgow, G.J. (2001). Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal* 15, 627-34.
- Barthel, A., Schmoll, D., Unterman, T.G. (2005). Foxo proteins in insulin action and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16, 183-189.
- Bartke, A., Coshigano, K., Kopchick, J., Chandrashekar, V., Mattison, J., Kinney, B., Hauck, S. (2001a). Genes that prolong life: relationships of growth hormone and growth to aging and life span. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 56, B340-B349.
- Bartke, A., Wright, J.C., Mattison, J.A., Ingram, D.K., Miller, R.A., Roth, G.S. (2001b). Longevity - extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 414, 412.
- Bayne, A.C., Sohal, R.S. (2002). Effects of superoxide dismutase/catalase mimetics on life span and oxidative stress resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 1229-34.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78, 547-81.
- Belcourt, L., Begel, O., Mossé, M., Vierny, C. (1981). Mitochondrial DNA amplification in senescent cultures of *Podospira anserina*: variability between the retained, amplified sequences. *Current Genetics* 3, 13-21.
- Berdichevsky, A., Viswanathan, M., Horvitz, H.R., Guarente, L. (2006). *C. elegans* Sir-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate *daf-16* and extend life span. *Cell* 125, 1165-1177.
- Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z. (2003). The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57, 203-208.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272, 20313-20316.
- Berman, J.R., Kenyon, C. (2006). Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of *daf-*

- 16 by *kri-1* and lipophilic-hormone signaling. *Cell* 124, 1055-1068.
- Bewick, V., Cheek, L., Ball, J. (2004). Statistics Review 12: Survival Analysis. *Critical Care* 8, 389-394.
- Birnby, D.A., Link, E.M., Vowels, J.J., Tian, H., Colacurcio, P.L., Thomas, J.H. (2000). A transmembrane guanylyl cyclase (*daf-11*) and Hsp90 (*daf-21*) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155, 85-104.
- Bishop, N.A., Guarente, L. (2007). Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 447, 545-U1.
- Blackburn, E.H., Szostak, J.W. (1984). The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annual Review of Biochemistry* 53, 163-194.
- Bland, J.M., Altman, D.G. (2004). The logrank test. *British Medical Journal* 328, 1412.
- Blander, G., Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual Review of Biochemistry* 73, 417-435.
- Blaxter, M. (1998). *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* 282, 2041-2046.
- Bluher, M., Kahn, B.B., Kahn, C.R. (2003). Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299, 572-574.
- Blum, J., Fridovich, I. (1983). Superoxide, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity in two free-living nematode species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 222, 35-43.
- Bodkin, N.L., Alexander, T.M., Ortmeier, H.K., Johnson, E., Hansen, B.C. (2003). Mortality and morbidity in laboratory-maintained rhesus monkeys and effects of long-term dietary restriction. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 58, 212-219.
- Bohni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B.F., Beckingham, K., Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97, 865-75.
- Bohr, V.A. (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 804-812.
- Bolanowski, M.A., Russell, R.L., Jacobson, L.A. (1981). Quantitative measures of aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Population and longitudinal studies of two behavioral parameters. *Mechanisms of Ageing and Development* 15, 279-295.
- Bonafe, M., Barbieri, M., Marchegiani, F., Olivieri, F., Ragno, E., Giampieri, C., Mugianesi, E., Centurelli, M., Franceschi, C., Paolisso, G. (2003). Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (Igf-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect Igf-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88, 3299-3304.
- Bordone, L., Motta, M.C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U.S., Apfeld, J., McDonagh, T., Lemieux, M., Mcburney, M., Szilvasi, A., Easlson, E.J., Lin, S.J., Guarente, L. (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing ucp2 in pancreatic beta cells. *PloS Biology* 4, 210-220.

Borghouts, C., Benguria, A., Wawryn, J., Jazwinski, S.M. (2004). Rtg2 protein links metabolism and genome stability in yeast longevity. *Genetics* *166*, 765-777.

Borghouts, C., Kimpel, E., Osiewacz, H.D. (1997). Mitochondrial DNA rearrangements of *Podospira anserina* are under the control of the nuclear gene *grisea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 10768-10773.

Borghouts, C., Scheckhuber, C.Q., Stephan, O., Osiewacz, H.D. (2002). Copper homeostasis and aging in the fungal model system *Podospira anserina*: differential expression of *Pactr3* encoding a copper transporter. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *34*, 1355-1371.

Borghouts, C., Werner, A., Elthon, T., Osiewacz, H.D. (2001). Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Molecular and Cellular Biology* *21*, 390-399.

Borman, A.M., Michel, Y.M., Kean, K.M. (2000). Biochemical characterisation of cap-Poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Research* *28*, 4068-4075.

Borra, M.T., Smith, B.C., Denu, J.M. (2005). Mechanism of human Sirt1 activation by resveratrol. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 17187-17195.

Bota, D.A., Davies, K.J. (2002a). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nature Cell Biology* *4*, 674-680.

Bota, D.A., Van Remmen, H., Davies, K.J.A. (2002b). Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Letters* *532*, 103-106.

Braeckman, B.P., De Vreese, A., Vanfleteren, J.R. (1998). Authors' response to commentaries on "Two-parameter logistic and Weibull equations provide better fits to survival data from isogenic populations of *Caenorhabditis elegans* in axenic culture than does the Gompertz model". *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* *53*, B407-B408.

Braeckman, B.P., Demetrius, L., Vanfleteren, J.R. (2006). The dietary restriction effect in *C. elegans* and humans: is the worm a one-millimeter human? *Biogerontology* *7*, 127-133.

Braeckman, B.P., Houthoofd, K., Brys, K., Lenaerts, I., De Vreese, A., Van Eygen, S., Raes, H., Vanfleteren, J.R. (2002a). No reduction of energy metabolism in Clk mutants. *Mechanisms of Ageing and Development* *123*, 1447-56.

Braeckman, B.P., Houthoofd, K., De Vreese, A., Vanfleteren, J.R. (1999). Apparent uncoupling of energy production and consumption in long-lived Clk Mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* *9*, 493-496.

Braeckman, B.P., Houthoofd, K., De Vreese, A., Vanfleteren, J.R. (2002b). Assaying metabolic activity in ageing *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* *123*, 105-19.

Braeckman, B.P., Houthoofd, K., De Vreese, A., Vanfleteren, J.R. (1999). Apparent uncoupling of energy production and consumption in long-lived Clk mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* *9*, 493-6.

Braeckman, B.P., Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R. (2002c). Assessing metabolic activity in aging *Caenorhabditis elegans*: concepts and controversies. *Aging Cell* *1*, 82-88.

- Braeckman, B.P., Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R. (2002d). Rebuttal to Van Voorhies: 'The influence of metabolic rate on longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*'. *Aging Cell* 1, 89-90.
- Braeckman, B.P., Vanfleteren, J.R. (2007). Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Experimental Gerontology* 42, 90-98.
- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 755-767.
- Breen, A.P., Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 1033-1077.
- Breese, C.R., Ingram, R.L., Sonntag, W.E. (1991). Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insuline-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins. *Journals of Gerontology* 46, B180-187.
- Brenner, S. (1974). Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Broccoli, D., Young, J.W., de Lange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9082-6.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology* 11, 213-221.
- Brooks, A., Lithgow, G.J., Johnson, T.E. (1994). Mortality rates in a genetically heterogeneous population of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 263, 668-671.
- Bross, T.G., Rogina, B., Helfand, S.L. (2005). Behavioral, physical, and demographic changes in *Drosophila* populations through dietary restriction. *Aging Cell* 4, 309-317.
- Broue, F., Liere, P., Kenyon, C., Baulieu, E.E. (2007). A steroid hormone that extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 6, 87-94.
- Brown, G.C., Borutaite, V. (2001). Nitric Oxide, Mitochondria, and Cell Death. *Iubmb Life* 52, 189-195.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-68.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y.X., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H.L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S.P., Sinclair, D.A., Alt, F.W., Greenberg, M.E. (2004). Stress-dependent regulation of Foxo transcription factors by the Sirt1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.
- Brys, K., Vanfleteren, J.R., Braeckman, B.P. (2007). Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 20.
- Bulitta, C., Ganea, C., Fahimi, H.D., Völkl, A. (1996). Cytoplasmic and peroxisomal catalases of the guinea pig liver: evidence for two distinct proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1293, 55-62.

- Burnell, A.M., Houthoofd, K., O'Hanlon, K., Vanfleteren, J.R. (2005). Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* **40**, 850-856.
- Burton, G.W., Ingold, K.U. (1989). Vitamin E as an in vivo antioxidant. *Annals of the New York Academy of Sciences* **570**, 7-22.
- C. elegans sequencing consortium. (1998). *Science* **282**, 2012-2018.
- Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer* **33**, 703-709.
- Carey, J.R., Liedo, P., Orozco, D., Vaupel, J.W. (1992). Slowing of mortality rates at older ages in large medfly cohorts. *Science* **258**, 457-461.
- Carroll, K., Gomez, C., Shapiro, L. (2004). Tubby proteins: the plot thickens. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 55-63.
- Carvalho, G.B., Kapahi, P., Benzer, S. (2005). Compensatory ingestion upon dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. *Nature Methods* **2**, 813-815.
- Cassada, R.C., Russell, R.L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **46**, 326-42.
- Cassano, P., Lezza, A.M., Leeuwenburgh, C., Cantatore, P., Gadaleta, M.N. (2004). Measurement of the 4,834-bp mitochondrial DNA deletion level in aging rat liver and brain subjected or not to caloric restriction diet. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1019**, 269-273.
- Chance, B., Sies, H., Boveries, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* **59**, 527-605.
- Chapman, T., Partridge, L. (1996). Female fitness in *Drosophila melanogaster*: an interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **263**, 755-759.
- Chen, C., Jack, J., Garofalo, R.S. (1996). The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology* **137**, 846-856.
- Chen, D., Guarente, L. (2007). Sir2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends in Molecular Medicine* **13**, 64-71.
- Chen, D., Steele, A.D., Lindquist, S., Guarente, L. (2005). Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* **310**, 1641.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730.
- Cheng, A.C., Lu, N.C., Briggs, G.M., Stokstad, E.L.R. (1979). Effect of particulate materials on population growth of the free-living nematode *Caenorhabditis briggsae*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **160**, 203-207.
- Chippindale, A.K., Leroi, A.M., Kim, S.B., Rose, M.R. (1993). Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution.1. Nutrition and the cost of reproduction. *Journal of Evolutionary*

Biology 6, 171-193.

Chow, D.K., Glenn, C.F., Johnston, J.L., Goldberg, I.G., Wolkow, C.A. (2006). Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan. *Experimental Gerontology* 41, 252-260.

Cichy, S.B., Uddin, S., Danilkovich, A., Guo, S.D., Klippel, A., Unterman, T.G. (1998). Protein kinase B/Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression through a conserved insulin response sequence. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6482-6487.

Clancy, D.J., Gems, D., Hafen, E., Leevers, S.J., Partridge, L. (2002). Dietary restriction in long-lived dwarf flies. *Science* 296, 319.

Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leevers, S.J., Partridge, L. (2001). Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292, 104-6.

Clokey, G.V., Jacobson, L.A. (1986). The autofluorescent "lipofuscin granules" in the intestinal cells of *Caenorhabditis elegans* are secondary lysosomes. *Mech Ageing Dev* 35, 79-94.

Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., De Cabo, R., Sinclair, D.A. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the Sirt1 deacetylase. *Science* 305, 390-392.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., Beach, D., Serrano, M. (2005). Tumour biology - Senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.

Conrad-Webb, H., Butow, R.A. (1995). A polymerase switch in the synthesis of ribosomal-RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2420-2428.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal* 17, 1195-1214.

Cooper, T.M., Mockett, R.J., Sohal, B.H., Sohal, R.S., Orr, W.C. (2004). Effect of caloric restriction on life span of the housefly, *Musca domestica*. *FASEB Journal* 18, 1591-1593.

Corbisier, P., Houbion, A., Remacle, J. (1987). A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Analytical Biochemistry* 164, 240-7.

Coschigano, K.T., Clemmons, D., Bellush, L.L., Kopchick, J.J. (2000). Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology* 141, 2608-2613.

Crapo, J.D., McCord, J.M., Fridovich, I. (1978). Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods in Enzymology* 53, 382-93.

Crichton, R.R., Charloteaux-Wauters, M. (1987). Iron transport and storage. *European Journal of Biochemistry* 164, 485-506.

Crofton, H.D. (1966). Nematodes. Hutchinson University Library, London.

Croll, L.A., Smith J.M., Zuckerman, B.M. (1977). The aging process of the nematode *Caenorhabditis*

- elegans* in bacterial and axenic culture. *Experimental Aging Research* **3**, 175-189.
- Cross, A.R., Jones, O.T. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta* **1057**, 281-298.
- Cuervo, A.M., Bergamini, E., Brunk, U.T., Dröge, W., French, M., Terman, A. (2005). Autophagy and aging – The importance of maintaining “clean” cells. *Autophagy* **1**, 131-140.
- Curtis, R., O'connor, G., Distefano, P.S. (2006). Aging networks in *Caenorhabditis elegans*: AMP-activated protein kinase (*aak-2*) links multiple aging and metabolism pathways. *Aging Cell* **5**, 119-126.
- Curtsinger, J.W., Fukui, H.H., Townsend, D.R., Vaupel, J.W. (1992). Demography of genotypes - Failure of the limited life span paradigm in *Drosophila melanogaster*. *Science* **258**, 461-463.
- Cutler, R.G., Mattson, M.P. (2006). Introduction: the adversities of aging. *Ageing Research Reviews* **5**, 221-238.
- Czapski, G. (1984). Reaction of .OH. *Methods in Enzymology* **105**, 209-215.
- Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Aratani, S., Ohshima, T., Miyagishi, M., Nakajima, T., Fukamizu, A. (2004). Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10042-10047.
- Das, N., Levine, R.L., Orr, W.C., Sohal, R.S. (2001). Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J* **360**, 209-16.
- Davies, K. J. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochemie* **83**, 301-10.
- Davis, B.O., Anderson, G.L., Dusenbery, D.B. (1982). Total luminescence spectroscopy of fluorescence changes during aging in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry* **21**, 4089-95.
- Davis, M.W., Somerville, D., Lee, R.Y.N., Lockery, S., Avery, L., Fambrough, D.M. (1995). Mutations in the *Caenorhabditis elegans* Na,K-ATPase alpha subunit gene, *eat-6*, disrupt excitable cell function. *Journal of Neuroscience* **15**, 8408-8418.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK Group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252.
- De Cabo, R., Furer-Galban, S., Anson, R.M., Gilman, C., Gorospe, M., Lane, M.A. (2003). An in vitro model of caloric restriction. *Experimental Gerontology* **38**, 631-639.
- de Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 323-329.
- de Lange, T., Shiue, L., Myers, R.M., Cox, D.R., Naylor, S.L., Killery, A.M., Varmus, H.E. (1990). Structure and variability of human-chromosome ends. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 518-527.
- de Magalhães, J. P. and Church, G. M. (2006). Cell discover fire: Employing reactive oxygen species in development and consequences for aging. *Experimental Gerontology* **41**, 1-10.
- de Magalhães, J.P. (2004). From cells to ageing: a review of models and mechanisms of cellular senescence and their impact on human ageing. *Experimental Cell Research* **300**, 1-10.

- de Magalhães, J.P. (2005). Open-minded scepticism: Inferring the causal mechanisms of human ageing from genetic perturbations. *Ageing Research Reviews* 4, 1-22.
- de Magalhães, J.P., Cabral, J.A.S., Magalhaes, D. (2005). The influence of genes on the aging process of mice: a statistical assessment of the genetics of aging. *Genetics* 169, 265-274.
- de Magalhães, J.P., Church, G.M. (2005). Genomes optimize reproduction: aging as a consequence of the developmental program. *Physiology* 20, 252-259.
- Demetrius, L. (2004). Caloric restriction, metabolic rate, and entropy. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 59, 902-915.
- Dhahbi, J.M., Kim, H.J., Mote, P.L., Beaver, R.J., Spindler, S.R. (2004). Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5524-5529.
- Dillin, A., Crawford, D.K., Kenyon, C. (2002a). Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*. *Science* 298, 830-4.
- Dillin, A., Hsu, A.L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Kenyon, C. (2002b). Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* 298, 2398-401.
- Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C. (2006). Caloric restriction in humans: potential pitfalls and health concerns. *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 1-7.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 1102-1115.
- Dorman, J.B., Albinder, B., Shroyer, T., Kenyon, C. (1995). The *age-1* and *daf-2* genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141, 1399-406.
- Driver, C. (2001). The Gompertz function does not measure ageing. *Biogerontology* 2, 61-5.
- Dröge, W. (2004). Autophagy and aging – importance of amino acid levels. *Mechanisms of Ageing and Development* 125, 161-168.
- Du, G., Mouithys-Mickalad, A., Sluse, F.E. (1998). Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* 25, 1066-1074.
- Dufour, E., Boulay, J., Rincheval, V., Sainsard-Chanet, A. (2000). A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4138-4143.
- Duret, L., Guex, N., Peitsch, M.C., Bairoch, A. (1998). New insulin-like proteins with atypical disulfide bond pattern characterized in *Caenorhabditis elegans* by comparative sequence analysis and homology modeling. *Genome Research* 8, 348-53.
- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale, W., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R., Butow, R.A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Molecular Biology of the Cell* 12, 297-308.

Epstein, H.F., Shakes, D.C. (eds.) (1995). *Caenorhabditis elegans*: modern biological analysis of an organism (Methods in Cell Biology, volume 48). Academic Press, New York.

Erlanger, M., Gershon, D. (1970). Studies on aging in nematodes. II. Studies of the activities of several enzymes as a function of age. *Experimental Gerontology* 5, 13-19.

Espósito, F., Ammendola, R., Faraonio, R., Russo, T., Cimino, F. (2004). Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. *Neurochemical Research* 29, 617-628.

Ewbank, J.J., Barnes, T.M., Lakowski, B., Lussier, M., Bussey, H., Hekimi, S. (1997). Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* 275, 980-3.

Fabian, T.J., Johnson, T.E. (1994). Production of age-synchronous mass-cultures of *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology* 49, B145-B156.

Fabian, T.J., Johnson, T.E. (1995). Identification of genes that are differentially expressed during aging in *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 50, B245-53.

Fabrizio, P., Gattazzo, C., Battistella, L., Wei, M., Cheng, C., McGrew, K., Longo, V.D. (2005). Sir2 blocks extreme life span extension. *Cell* 123, 655-667.

Fabrizio, P., Pletcher, S.D., Minois, N., Vaupel, J.W., Longo, V.D. (2004). Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 557, 136-142.

Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S.D., Gendron, C.M., Longo, V.D. (2001). Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*.

Faulkner, K., Fridovich, I. (1993). Luminol and lucigenin as detectors for $O_2^{\cdot-}$. *Free Radical Biology and Medicine* 15, 447-51.

Fei, Y.J., Fujita, T., Lapp, D.F., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1998). Two oligopeptide transporters from *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning and functional expression. *Biochemical Journal* 332, 565-572.

Fei, Y.J., Inoue, K., Ganapathy, V. (2003). Structural and functional characteristics of two sodium-coupled dicarboxylate transporters (ceNaDC1 and ceNaDC2) from *Caenorhabditis elegans* and their relevance to life span. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6136-44.

Fei, Y.J., Liu, J.C., Inoue, K., Zhuang, L., Miyake, L., Miyauchi, S., Ganapathy, V. (2004). Relevance of Nac-2, and Na⁺-coupled citrate transporter, to life span, body size and fat content in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal* 379, 191-198.

Felkai, S., Ewbank, J.J., Lemieux, J., Labbe, J.C., Brown, G.G., Hekimi, S. (1999). CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal* 18, 1783-92.

Feng, J., Bussiere, F., Hekimi, S. (2001). Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* 1, 633-44.

Fenton, H.J.H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society* 65, 899-910.

- Feuers, R.J., Weindruch, R., Hart, R.W. (1993). Caloric restriction, aging, and antioxidant enzymes. *Mutation Research* 295, 191-200.
- Finch, C. (1990). Longevity, senescence and the genome. The University of Chicago Press.
- Finch, C.E., Pike, M.C., Witten, M. (1990). Slow mortality-rate accelerations during aging in some animals approximate that of humans. *Science* 249, 902-905.
- Finch, C.E., Tanzi, R.E. (1997). Genetics of aging. *Science* 278, 407-11.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-47.
- Flint, D.H., Tuminello, J.F., Emptage, M.H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydrolyases by superoxide. *Journal of Biological Chemistry* 268, 22369-22376.
- Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R.A., Harrison, D.E. (2001). Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6736-6741.
- Foll, R.L., Pleyers, A., Lewandowski, G.J., Wermter, C., Hegemann, V., Paul, R.J. (1999). Anaerobiosis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology* 124, 269-80.
- Fontana, L., Klein, S. (2007). Aging, adiposity, and calorie restriction. *Journal of the American Medical Association* 297, 986-994.
- Fontana, L., Meyer, T.E., Klein, S., Holloszy, J.O. (2004). Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6659-6663.
- Fox, C.W., Moya-Larano, J. (2003). Why organisms show late-life mortality plateaus: a null model for comparing patterns of mortality. *Evolutionary Ecology Research* 5, 999-1009.
- Frei, B., Stocker, R., England, L., Ames, B.N. (1990). Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Advances in Experimental and Medical Biology* 264, 155-163.
- Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry* 264, 7761-7764.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 64, 97-112.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology* 201, 1203-9.
- Fridovich, I. (2004). Mitochondria: Are they the seat of senescence? *Aging Cell* 3, 13-16.
- Friedman, D.B., Johnson, T.E. (1988). A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118, 75-86.
- Frye, R.A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins.

Biochemical and Biophysical Research Communications 273, 793-798.

Fujii, M., Ishii, N., Joguchi, A., Yasuda, K., Ayusawa, D. (1998). A novel superoxide dismutase gene encoding membrane-bound and extracellular isoforms by alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. DNA Research 5, 25-30.

Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., Mori, N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. Biochem Journal 349, 629-634.

Gabbianelli, R., Battistoni, A., Polizio, F., Carri, M.T., Demartino, A., Meier, B., Desideri, A., Rotilio, G. (1995). Metal uptake of recombinant cambialistic superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii* affected by growth conditions of host *Escherichia coli* cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 216, 841-847.

Gami, M.S., Iser, W.B., Hanselman, K.B., Wolkow, C.A. (2006). Activated Akt/PKB signaling in *C. elegans* uncouples temporally distinct outputs of Daf-2/Insulin-like signaling. BMC Developmental Biology 6.

Gami, M.S., Wolkow, C.A. (2006). Studies of *Caenorhabditis elegans* Daf-2/Insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan. Aging Cell 5, 31-37.

Gardner, P.R., Fridovich, I. (1991). Superoxide Sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. Journal of Biological Chemistry 266, 19328-19333.

Garigan, D., Hsu, A.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Kenyon, C. (2002). Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*. A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. Genetics 161, 1101-12.

Garsin, D.A., Villanueva, J.M., Begun, J., Kim, D.H., Sifri, C.D., Calderwood, S.B., Ruvkun, G., Ausubel, F.M. (2003). Long-lived *C. elegans daf-2* mutants are resistant to bacterial pathogens. Science 300, 1921.

Geley, S., Muller, C. (2004). RNAi: ancient mechanism with a promising future. Experimental Gerontology 39, 985-998.

Geller, B.L., Winge, D.R. (1983). A method for distinguishing Cu,Zn-containing and Mn-containing superoxide dismutases. Analytical Biochemistry 128, 86-92.

Gems, D., McElwee, J.J. (2005). Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/Igf-1 signaling? Mechanisms of Ageing and Development 126, 381-387.

Gems, D., Partridge, L. (2001). Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. Current Opinion in Genetics and Development 11, 287-92.

Gems, D., Pletcher, S., and Partridge, L. (2002). Interpreting interactions between treatments that slow aging. Aging Cell 1, 1-9.

Gems, D., Riddle, D.L. (2000a). Defining wild-type life span in *Caenorhabditis elegans*. Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences 55, B215-B219.

Gems, D., Riddle, D.L. (2000b). Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 154, 1597-610.

- Gems, D., Sutton, A.J., Sundermeyer, M.L., Albert, P.S., King, K.V., Edgley, M.L., Larsen, P.L., Riddle, D.L. (1998). Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 150, 129-55.
- Gerisch, B., Weitzel, C., Kober-Eisermann, C., Rottiers, V., Antebi, A. (2001). A Hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span. *Developmental Cell* 1, 841-851.
- Gershon, H., Gershon, D. (2000). Paradigms in aging research: a critical review and assessment. *Mechanisms of Ageing and Development* 117, 21-8.
- Gershon, H., Gershon, D. (2002). *Caenorhabditis elegans*-a paradigm for aging research: advantages and limitations. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 261-274.
- Gerstbrein, B., Stamatas, G., Kollias, N., Driscoll, M. (2005). In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 4, 127-137.
- Gieseg, S., Duggan, S., Gebicki, J.M. (2000). Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochemical Journal* 350, 215-218.
- Giglio, A.M., Hunter, T., Bannister, J.V., Bannister, W.H., Hunter, G.J. (1994). The copper/zinc superoxide dismutase gene of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry and Molecular Biology International* 33, 41-44.
- Gilley, J., Coffey, P.J., Ham, J. (2003). Foxo transcription factors directly activate Bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *Journal of Cell Biology* 162, 613-622.
- Glenn, C.F., Chow, D.K., David, L., Cooke, C.A., Gami, M.S., Iser, W.B., Hanselman, K.B., Goldberg, I.G., Wolkow, C.A. (2004). Behavioral deficits during early stages of aging in *Caenorhabditis elegans* result from locomotory deficits possibly linked to muscle frailty. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 59, 1251-1260.
- Golden, J.W., Riddle, D.L. (1982). A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 218, 578-80.
- Golden, J.W., Riddle, D.L. (1984). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology* 102, 368-78.
- Golden, T.R., Melov, S. (2004). Microarray analysis of gene expression with age in individual nematodes. *Aging Cell* 3, 111-124.
- Gompertz, B. (1825). On the nature of the function expressive of the law of human mortality. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London* 115, 513-585.
- Gonzales-Pacheco, D.M., Buss, W.C., Koehler, K.M., Woodside, W.F., Alpert, S.S. (1993). Energy restriction reduces metabolic rate in adult male Fisher 344 rats. *Journal of Nutrition* 123, 90-97.
- Gorbunova, V., Seluanov, A. (2002). CLK-1 protein has DNA binding activity specific to O(L) region of mitochondrial DNA. *FEBS Letters* 516, 279-84.

Goren, P., Reznick, A.Z., Reiss, U., Gershon, D. (1977). Isoelectric properties of nematode aldolase and rat liver superoxide dismutase from young and old animals. *FEBS Letters* **84**, 83-6.

Goto, S.G., Yoshida, K.M., Kimura, M.T. (1998). Accumulation of Hsp70 mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. *Journal of Insect Physiology* **44**, 1009-1015.

Gottlieb, S., Ruvkun, G. (1994). *daf-2*, *daf-16* and *daf-23*: genetically interacting genes controlling dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **137**, 107-20.

Goyns, M.H., Lavery, W.L. (2000). Telomerase and mammalian ageing: a critical appraisal. *Mechanisms of Ageing and Development* **114**, 69-77.

Greider, C.W. (1996). Telomere length regulation. *Annual Review of Biochemistry* **65**, 337-365.

Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413.

Guarente, L. (1999). Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nature Genetics* **23**, 281-285.

Guarente, L. (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes & Development* **14**, 1021-1026.

Guarente, L. (2003). Age-less quest. One scientist's search for genes that prolong youth. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Gupta, S.K., Rothstein, M. (1976). Phosphoglycerate kinase from young and old *Turbatrix aceti*. *Biochimica et Biophysica Acta* **445**, 632-644.

Gutteridge, J.M., Stocks, J. (1981). Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **14**, 257-329.

Haber, F., Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London A Mathematical and Physical Science* **147**, 332-351.

Halaschek-Wiener, J., Khattri, J.S., McKay, S., Pouzyrev, A., Stott, J.M., Yang, G.S., Holt, R.A., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Brooks-Wilson, A.R., Riddle, D.L. (2005). Analysis of long-lived *C. elegans daf-2* mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Research* **15**, 603-615.

Haldane, J.B.S. (1941). New paths in genetics. Allen and Unwin, London.

Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species - Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* **281**, 9-19.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* **186**, 1-85.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, third edition. Oxford University Press, UK.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen-toxicity, oxygen radicals, transition-metals and disease.

Biochemical Journal *219*, 1-14.

Hamilton, B., Doug, Y.Q., Shindo, M., Liu, W.Y., Odell, I., Ruvkun, G., Lee, S.S. (2005). A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes & Development* *19*, 1544-1555.

Han, E.S., Hickey, M. (2005). Microarray evaluation of dietary restriction. *Journal of Nutrition* *135*, 1343-1346.

Hansen, E. L., Perez-Mendez, G., and Buecher, E. J. (1971). Glycogen as a supplement in media for axenic cultivation of nematodes. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* *137*, 1352-1354.

Hansen, E.L., Buecher, E.J., Yarwood, E.A. (1964). Development and maturation of *Caenorhabditis briggsae* in response to growth factor. *Nematologica* *10*, 623-630.

Hansen, M., Hsu, A.L., Dillin, A., Kenyon, C. (2005). New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen. *PLoS Genetics* *1*, 119-128.

Hansen, M., Taubert, S., Crawford, D., Libina, N., Lee, S.J., Kenyon, C. (2007). Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* *6*, 95-110.

Hardie, D.G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway - New players upstream and downstream. *Journal of Cell Science* *117*, 5479-5487.

Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* *345*, 458-460.

Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., Gout, I., Downes, C.P., Lamb, R.E. (2004). The Tsc1-2 tumor suppressor controls insulin-P13k signaling via regulation of IRS proteins. *Journal of Cell Biology* *166*, 213-223.

Hars, E.S., Qi, H., Ryazanov, A.G., Jin, S., Cai, L., Hu, C., Liu, L.F. (2007). Autophagy regulates ageing in *C. elegans*. *Autophagy* *3*, 93-95.

Hart, R.W., Turturro, A. (1987). *Modern biological theories of aging*. Raven Press, New York.

Hartman, P.S., Ishii, N., Kayser, E., Morgan, P.G., Sedensky, M.M. (2001). Mitochondrial mutations differentially affect aging, mutability and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* *122*, 1187-201.

Hay, N., Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* *18*, 1926-1945.

Hayflick, L. (1998). How and why we age. *Experimental Gerontology* *33*, 639-653.

Hayflick, L. (2000). The future of ageing. *Nature* *408*, 267-9.

Hayflick, L. (2003). Living forever and dying in the attempt. *Experimental Gerontology* *38*, 1231-1241.

Hayflick, L., Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* *25*, 585-621.

Haynes, V., Elfering, S., Traaseth, N., Giulivi, C. (2004). Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **36**, 341-346.

Heilbronn, L.K., Ravussin, E. (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* **78**, 361-369.

Heitman, J., Movva, N.R., Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-909.

Hekimi, S., Benard, C., Branicky, R., Burgess, J., Hihi, A.K., Rea, S. (2001). Why only time will tell. *Mechanisms of Ageing and Development* **122**, 571-594.

Hekimi, S., Guarente, L. (2003). Genetics and the specificity of the aging process. *Science* **299**, 1351-4.

Henderson, S.T., Bonafe, M., Johnson, T.E. (2006). *daf-16* protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **61**, 444-460.

Henderson, S.T., Johnson, T.E. (2001). *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* **11**, 1975-1980.

Herndon, L.A., Schmeissner, P.J., Dudaronek, J.M., Brown, P.A., Listner, K.M., Sakano, Y., Paupard, M.C., Hall, D.H., Driscoll, M. (2002). Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature* **419**, 808-814.

Hertweck, M., Gobel, C., Baumeister, R. (2004). *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/Pkb kinase complex to control stress response and life span. *Developmental Cell* **6**, 577-588.

Hill, H.A. (1981). Oxygen, oxidases, and the essential trace metals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Science* **294**, 119-128.

Hipkiss, AR. (2006). Does chronic glycolysis accelerate aging? Could this explain how dietary restriction works? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1067**, 361-368.

Hodgkin, J., Horvitz, H.R., Brenner, S. (1979). Nondisjunction mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **91**, 67-94.

Hodgkin, J.A. (1997). Appendix 1: Genetics. In: Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess J.R. (eds.) *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Holcik, M., Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 318-327.

Holehan, A.M., Merry, B.J. (1985). Lifetime breeding studies in fully fed and dietary restricted female CFY Sprague-Dawley rats. 1. Effect of age, housing conditions and diet on fecundity. *Mechanisms of Ageing and Development* **33**, 19-28.

Holehan, A.M., Merry, B.J. (1986). The experimental manipulation of ageing by diet. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **61**, 329-368.

Holliday, R. (1989). Food, reproduction and longevity: is the extended lifespan of calorie-restricted animals an evolutionary adaptation? *Bioessays* **10**, 125-7.

- Holliday, R. (2006). Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067, 1-9.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., G  lo  n, A., Evens, P.C., Cervera, P., Le Bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182-187.
- Honda, S., Ishii, N., Suzuki, K., Matsuo, M. (1993). Oxygen-dependent perturbation of life span and aging rate in the nematode. *Journals of Gerontology* 48, B57-61.
- Honda, Y., Honda, S. (1999). The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal* 13, 1385-93.
- Hope, I.A. (1999). *C. elegans. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hopkin, K. (2003). Dietary drawbacks. *Science of Aging Knowledge Environment* 26, NS4.
- Hosokawa, H., Ishii, N., Ishida, H., Ichimori, K., Nakazawa, H., Suzuki, K. (1994). Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant *mev-1* of *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* 74, 161-70.
- Hosono, R., Nishimoto, S., Kuno, S. (1989). Alterations of life-span in the nematode *Caenorhabditis elegans* under monoxenic culture conditions. *Experimental Gerontology* 24, 251-264.
- Hosono, R., Sato, Y., Aizawa, S.I., Misui, Y. (1980). Age-dependent changes in mobility and separation of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 15, 285-289.
- Houthoofd, K. (2003). In: doctoraatsthesis: Genetisch, fysiologisch en biochemisch onderzoek van veroudering en potenti  le levensduur in *Caenorhabditis elegans*, p. 153-169.
- Houthoofd, K., Braeckman, B.P., De Vreese, A., Van Eygen, S., Lenaerts, I., Brys, K., Matthijssens, F., Vanfleteren, J.R. (2004a). Caloric restriction, Ins/IGF-1 signalling and longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Belgian Journal of Zoology* 134, 79-84.
- Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Johnson, T.E., Vanfleteren, J.R. (2003a). Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 38, 947-954.
- Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J.R. (2002a). Ageing is reversed, and metabolism is reset to young levels in recovering dauer larvae of *C. elegans*. *Experimental Gerontology* 37, 1015-1021.
- Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J.R. (2002b). Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 37, 1369-1376.
- Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J.R. (2002c). No reduction of metabolic rate in food restricted *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 37, 1357-1367.
- Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Lenaerts, I., Brys, K., Matthijssens, F., De Vreese, A., Van Eygen, S., Vanfleteren, J.R. (2005a). *daf-2* pathway mutations and food restriction in aging *Caenorhabditis*

elegans differentially affect metabolism. *Neurobiology of Aging* **26**, 689-696.

Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Vanfleteren, J.R. (2003b). Metabolism and life span determination. In: Mattson, M.P. (ed.), *Advances in Cell Aging and Gerontology* **14**, 143-175.

Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Vanfleteren, J.R. (2004b). The hunt for the record life span in *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **59**, 408-410.

Houthoofd, K., Fidalgo, M.A., Hoogewijs, D., Braeckman, B.P., Lenaerts, I., Brys, K., Matthijssens, F., De Vreese, A., Van Eygen, S., Munoz, M.J., Vanfleteren, J.R. (2005b). Metabolism, physiology and stress defense in three aging Ins/IGF-1 mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **4**, 87-95.

Houthoofd, K., Gems, D., Johnson, T. E., and Vanfleteren, J. R. (2007). Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Mechanisms of dietary restriction in aging and disease* **35**, 98-114.

Houthoofd, K., Johnson, T.E., Vanfleteren, J.R. (2005c). Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **60**, 1125-1131.

Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R. (2006). The longevity effect of dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* **41**, 1026-1031.

Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B., Sinclair, D.A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 191-196.

Hsin, H., Kenyon, C. (1999). Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* **399**, 362-6.

Hsu, A.L., Murphy, C.T., Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **300**, 1142-5.

Huang, C., Xiong, C.J., Kornfeld, K. (2004). Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8084-8089.

Huang, T.T., Carlson, E.J., Gillespie, A.M., Shi, Y., Epstein, C.J. (2000). Ubiquitous overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *Journals of Gerontology A Biological Sciences and Medical Sciences* **55**, B5-9.

Hulbert, A.J., Clancy, D.J., Mair, W., Braeckman, B.P., Gems, D., Partridge, L. (2004). Metabolic rate is not reduced by dietary-restriction or by lowered insulin/IGF-1 signalling and is not correlated with individual lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* **39**, 1137-1143.

Hunter, T., Bannister, W.H., Hunter, G.J. (1997). Cloning, expression, and characterization of two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 28652-28659.

Hwangbo, D.S., Gersham, B., Tu, M.P., Palmer, M., Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFoxo controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* **429**, 562-566.

- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeblerlein, M., Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD- dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.
- Inestrosa, N.C., Bronfman, M., Leighton, F. (1979). Detection of peroxisomal fatty acyl-coenzyme-a oxidase activity. *Biochemical Journal* **182**, 779-788.
- Ingram, D.K., Roth, G.S., Lane, M.A., Ottinger, M.A., Zou, S., De Cabo, R., Mattison, J.A. (2006). The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. *Biogerontology* **7**, 143-148.
- Ingram, D.K., Zhu, M., Mamczarz, J., Zou, S.G., Lane, M.A., Roth, G.S., Decabo, R. (2006). Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell* **5**, 97-108.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T.Q., Wu, J., Guan, K.L. (2002). Tsc2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology* **4**, 648-657.
- Inoki, K., Zhu, T.Q., Guan, K.L. (2003). Tsc2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590.
- Inoue, H., Hisamoto, N., An, J.H., Oliveira, R.P., Nishida, E., Blackwell, T.K., Matsumoto, K. (2005). The *C. elegans* P38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor *skn-1* in oxidative stress response. *Genes & Development* **19**, 2278-2283.
- Iser, W.B., Gami, M.S., Wolkow, C.A. (2007). Insulin signaling in *Caenorhabditis elegans* regulates both endocrine-like and cell-autonomous outputs. *Developmental Biology* **303**, 434-447.
- Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P.S., Tsuda, M., Yasuda, K., Senoo-Matsuda, N., Yanase, S., Ayusawa, D., Suzuki, K. (1998). A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* **394**, 694-7.
- Ishii, N., Takahashi, K., Tomita, S., Keino, T., Honda, S., Yoshino, K., Suzuki K. (1990). A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutation Research* **237**, 165-171.
- Iwasaki, K., Gleiser, C.A., Masoro, E.J., McMahan, C.A., Seo, E.J., Yu, B.P. (1988a). The influence of dietary protein source on longevity and age-related disease processes of Fischer rats. *Journals of Gerontology* **43**, B5-12.
- Iwasaki, K., Gleiser, C.A., Masoro, E.J., McMahan, C.A., Seo, E.J., Yu, B.P. (1988b). Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fischer rats: the fat component and the mineral component. *Journals of Gerontology* **43**, B13-21.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., Jap, B.K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc(1) complex. *Science* **281**, 64-71.
- Jamet-Vierny, C., Boulay, J., Begel, O., Silar, P. (1997). Contribution of various classes of defective mitochondrial DNA molecules to senescence in *Podospira anserina*. *Current Genetics* **31**, 171-178.
- Jazwinski, S.M. (1993). The genetics of aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetica* **91**, 35-51.
- Jazwinski, S.M. (1999). The RAS genes: a homeostatic device in *Saccharomyces cerevisiae* longevity. *Neurobiology of Aging* **20**, 471-8.

- Jazwinski, S.M. (2002a). Biological aging research today: potential, peeves, and problems. *Experimental Gerontology* **37**, 1141-1146.
- Jazwinski, S.M. (2002b). Growing old: metabolic control and yeast aging. *Annual Review of Microbiology* **56**, 769-792.
- Jazwinski, S.M. (2005). Yeast longevity and aging - the mitochondrial connection. *Mechanisms of Ageing and Development* **126**, 243-248.
- Jenkins, N.L., Mccoll, G., Lithgow, G.J. (2004). Fitness cost of extended lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**, 2523-2526.
- Jensen, L.T., Culotta, V.C. (2005). Activation of Cu/Zn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone *ccs*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 41373-41379.
- Jeong, P.Y., Jung, M., Yim, Y.H., Kim, H., Park, M., Hong, E.M., Lee, W., Kim, Y.H., Kim, K., Paik, Y.K. (2005). Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. *Nature* **433**, 541-545.
- Jezek, P., Hlavata, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**, 2478-2503.
- Jia, K., Chen, D., Riddle, D.L. (2004). The Tor pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* **131**, 3897-3906.
- Jia, K., Levine, B. (2007). Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in *C. elegans*. *Autophagy* **3**.
- Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J., and Butow, R. A. (1997). A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Molecular Cell Biology* **17**, 1110-1117.
- Jiang, J.C., Jaruga, E., Repnevskaya, M.V., Jazwinski, S.M. (2000). An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB Journal* **14**, 2135-2137.
- Jiang, J.C., Wawryn, J., Shantha Kumara, H.M., Jazwinski, S.M. (2002). Distinct roles of processes modulated by histone deacetylases Rpd3p, Hda1p, and Sir2p in life extension by caloric restriction in yeast. *Experimental Gerontology* **37**, 1023-30.
- Johnson, T. E., Friedman, D. B., Foltz, N., Fitzpatrick, P. A., Shoemaker, J. E. (1990). Genetic effects on aging, Volume II. Harrison, D. E. (ed.), Teleford, Caldwell.
- Johnson, T.E. (1987). Aging can be genetically dissected into component processes using long-lived lines of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 3777-81.
- Johnson, T.E. (1990). Increased life-span of *age-1* mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* **249**, 908-12.
- Johnson, T.E. (2006). For the special issue: the nematode *Caenorhabditis elegans* in aging research. *Experimental Gerontology* **41**, 887-889.

- Johnson, T.E., de Castro, E., Hegi de Castro, S., Cypser, J., Henderson, S., Tedesco, P. (2001). Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* *36*, 1609-17.
- Johnson, T.E., McCaffrey, G. (1985). Programmed aging or error catastrophe - an examination by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mechanisms of Ageing and Development* *30*, 285-297.
- Johnson, T.E., Mitchell, D.H., Kline, S., Kemal, R., Foy, J. (1984). Arresting development arrests aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* *28*, 23-40.
- Johnson, T.E., Tedesco, P.M., Lithgow, G.J. (1993). Comparing mutants, selective breeding, and transgenics in the dissection of aging processes of *Caenorhabditis elegans*. *Genetica* *91*, 65-77.
- Johnson, T.E., Wu, D., Tedesco, P., Dames, S., Vaupel, J.W. (2001). Age-specific demographic profiles of longevity mutants in *Caenorhabditis elegans* show segmental effects. *Journals of Gerontology A Biological Sciences and Medical Sciences* *56*, B331-339.
- Jonassen, T., Larsen, P.L., Clarke, C.F. (2001). A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans clk-1* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 421-426.
- Jünger, M. A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J. D., Végh, M., Radimerski, T., Greenberg, M. E., and Hafen, E. (2003). The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *Journal of Biology* *2*, 20.
- Kabil, H., Partridge, L., Harshman, L.G. (2007). Superoxide dismutase activities in long-lived *Drosophila melanogaster* females: Chico(1) genotypes and dietary dilution. *Biogerontology* *8*, 201-208.
- Kaeberlein, M., Kirkland, K.T., Fields, S., Kennedy, B.K. (2004). Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biology* *2*, 1381-1387.
- Kaeberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E.A., Caldwell, S.D., Napper, A., Curtis, R., Distefano, P.S., Fields, S., Bedalov, A., Kennedy, B.K. (2005). Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 17038-17045.
- Kaeberlein, M., McVey, M., Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development* *13*, 2570-2580.
- Kaeberlein, M., Powers, R.W., Steffen, K.K., Westman, E.A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E.O., Kirkland, K.T., Fields, S., Kennedy, B.K. (2005). Regulation of yeast replicative life span by Tor and Sch9 in response to nutrients. *Science* *310*, 1193-1196.
- Kaeberlein, M., Steffen, K.K., Hu, D., Dang, N., Kerr, E.O., Tsuchiya, M., Fields, S., Kennedy, B.K. (2006). Comment on "Hst2 mediates Sir2-independent life-span extension by calorie restriction". *Science* *312*, 1312.
- Kaeberlein, T.L., Smith, E.D., Tsuchiya, M., Welton, K.L., Thomas, J.H., Fields, S., Kennedy, B.K., Kaeberlein, M. (2006). Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. *Aging Cell* *5*, 487-494.

Kagawa, Y. (1978). Impact of Westernization on the nutrition of Japanese: changes in physique, cancer, longevity and centenarians. *Preventive Medicine* 7, 205-217.

Kalant, N., Stewart, J. Kaplan, R. (1988). Effect of diet restriction on glucose metabolism and insulin responsiveness in aging rats. *Mechanisms of Ageing and Development* 46, 89-104.

Kapahi, P. and Zid, B. (2004). TOR Pathway: Linking nutrient sensing to life span. *Science of Aging Knowledge Environment* 36, 34.

Kapahi, P., Boulton, M.E., Kirkwood, T.B.L. (1999). Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 495-500.

Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., Benzer, S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current Biology* 14, 885-890.

Kaplan, E.L., Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistical Association* 53, 457-481.

Karin, M., Lin, A. (2002). NF-Kappa B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* 3, 221-227.

Kawano, T., Nagatomo, R., Kimura, Y., Gengyo-Ando, K., Mitani, S. (2006). Disruption of *ins-11*, a *Caenorhabditis elegans* insulin-like gene, and phenotypic analyses of the gene-disrupted animal. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70, 3084-3087.

Kayo, T., Allison, D.B., Weindruch, R., Prolla, T.A. (2001). Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5093-5098.

Kayser, E.B., Morgan, P.G., Hoppel, C.L., Sedensky, M.M. (2001). Mitochondrial expression and function of *gas-1* in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 20551-20558.

Kayser, E.B., Morgan, P.G., Sedensky, M.M. (1999). GAS-1: a mitochondrial protein controls sensitivity to volatile anesthetics in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Anesthesiology* 90, 545-554.

Kayser, E.B., Sedensky, M.M., Morgan, P.G. (2004). The effects of complex I function and oxidative damage on lifespan and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* 125, 455-464.

Kayser, E.B., Sedensky, M.M., Morgan, P.G., Hoppel, C.L. (2004). Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long-lived mutant *clk-1*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 54479-54486.

Keaney, M., Gems, D. (2003). No increase in lifespan in *Caenorhabditis elegans* upon treatment with the superoxide dismutase mimetic EUK-8. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 277-82.

Keaney, M., Matthijssens, F., Sharpe, M., Vanfleteren, J., Gems, D. (2004). Superoxide dismutase mimetics elevate superoxide dismutase activity in vivo but do not retard aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 239-250.

Keenan, K.P., Laroque, P., Dixit, R. (1998). Need for dietary control by caloric restriction in rodent toxicology and carcinogenicity studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B Critical*

Reviews 1, 135-148.

Kennedy, B.K., Austriaco, N.R. Jr, Zhang, J., Guarente, L. (1995). Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* 80, 485-96.

Kennedy, B.K., Smith, E.D., Kaerberlein, M. (2005). The enigmatic role of Sir2 in Aging. *Cell* 123, 548-550.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461-4.

Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., Cuervo, A.M. (2004). Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Molecular Biology of the Cell* 15, 4829-4840.

Kikuchi, S., Shinpo, K., Takeuchi, M., Yamagishi, S., Makita, Z., Sasaki, N., Tashiro, K. (2003). Glycation - a sweet tempter for neuronal death. *Brain Research Reviews* 41, 306-323.

Kim, J.D., McCarter, R.J., Yu, B.P. (1996). Influence of age, exercise, and dietary restriction on oxidative stress in rats. *Aging (Milano)* 8, 123-129.

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-5.

Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942-6.

Kimura, N., Tokunaga, C., Dalal, S., Richardson, C., Yoshino, K., Hara, K., Kemp, B.E., Witters, L.A., Mimura, O., Yonezawa, K. (2003). A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes to Cells* 8, 65-79.

Kipling, D., Cooke, H.J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347, 400-402.

Kipling, D., Faragher, R.G. (1999). Telomeres. Ageing hard or hardly ageing? *Nature* 398, 191, 193.

Kirby, K., Hu, J., Hilliker, A.J., Phillips, J.P. (2002). RNA interference-mediated silencing of Sod2 in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16162-16167.

Kirchman, P.A., Kim, S., Lai, C.Y., Jazwinski, S.M. (1999). Interorganellar signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 179-90.

Kirkwood, T. B. The origins of human ageing. (1997). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*. 352, 1765-72.

Kirkwood, T.B. (1977). Evolution of ageing. *Nature* 270, 301-304.

Kirkwood, T.B., Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature* 408, 233-8.

Kirkwood, T.B., Holliday, R. (1979). The evolution of ageing and longevity. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 205, 531-546.

Kirkwood, T.B., Rose, M.R. (1991). Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 332, 15-24.

Kirkwood, T.B.L. (2002). Evolution of ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 737-745.

Kirkwood, T.B.L. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell* 120, 437-447.

Kirkwood, T.B.L., Shanley, D.P. (2005). Food restriction, evolution and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 126, 1011-1016.

Klar, A.J.S., Fogel, S. (1979). Activation of mating type genes by transposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4539-4543.

Klass, M., Hirsh, D. (1976). Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 260, 523-525.

Klass, M.R. (1977). Aging in nematode *Caenorhabditis elegans* - Major biological and environmental factors influencing life span. *Mechanisms of Ageing and Development* 6, 413-429.

Klass, M.R. (1983). A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mechanisms of Ageing and Development* 22, 279-86.

Knapowski, J., Wieczorowska-Tobis, K., Witowski, J. (2002). Pathophysiology of ageing. *Journal of Physiology and Pharmacology* 53, 135-146.

Kondo, M., Senoo-Matsuda, N., Yanase, S., Ishii, T., Hartman, P.S., Ishii, N. (2005). Effect of oxidative stress on translocation of DAF-16 in oxygen-sensitive mutants, *mev-1* and *gas-1* of *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* 126, 637-641.

Konig, H. (2006). *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *Journal of Applied Microbiology* 101, 620-627.

Koop, D.R. (1992). Oxidative and reductive metabolism by cytochrome-P450-2e1. *FASEB Journal* 6, 724-730.

Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L., Burgering, B.M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398, 630-634.

Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* 416, 15-18.

Kowald, A. (2002). Lifespan does not measure ageing. *Biogerontology* 3, 187-190.

Krook, A., Brueton, L., O'Rahilly, S. (1993). Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene in infant with leprechaunism. *Lancet* 342, 277-278.

Kujoth, G.C., Bradshaw, P.C., Haroon, S., Prolla, T.A. (2007). The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PloS Genetics* 3, 161-173.

Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., Morrow, J.D., Van Remmen, H., Sedivy, J.M., Yamasoba, T., Tanokura, M.,

- Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., Prolla, T.A. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481-484.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochemical Journal* **368**, 545-553.
- Kwon, Y.W., Masutani, H., Nakamura, H., Ishii, Y., Yodoi, J. (2003). Redox regulation of cell growth and cell death. *Biological Chemistry* **384**, 991-996.
- Lai, C.Y., Jaruga, E., Borghouts, C., Jazwinski, S.M. (2002). A mutation in the Atp2 gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**, 73-87.
- Lakowski, B., Hekimi, S. (1996). Determination of life span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* **272**, 1010-1013.
- Lakowski, B., Hekimi, S. (1998). The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13091-13096.
- Lambert, A.J., Merry, B.J. (2004). Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **286**, R71-R79.
- Lambert, A.J., Wang, B., Yardley, J., Edwards, J., Merry, B.J. (2004). The effect of aging and caloric restriction on mitochondrial protein density and oxygen consumption. *Experimental Gerontology* **39**, 289-295.
- Lamming, D.W., Latorre-Esteves, M., Medvedik, O., Wong, S.N., Tsang, F.A., Wang, C., Lin, S.J., Sinclair, D.A. (2005). Hst2 mediates Sir2-independent life span extension by calorie restriction. *Science* **309**, 1861-1864.
- Lane, M.A., De Cabo, R., Mattison, J., Anson, R.M., Roth, G.S., Ingram, D.K. (2004). The Roy Walford legacy: diet restriction from molecules to mice to monkeys to man and onto mimetics. *Experimental Gerontology* **39**, 897-902.
- Larsen, P.L. (1993). Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8905-8909.
- Larsen, P.L., Albert, P.S., Riddle, D.L. (1995). Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **139**, 1567-83.
- Larsen, P.L., Clarke, C.F. (2002). Extension of life span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* **295**, 120-123.
- Le Bourg, E. (2006). Dietary restriction would probably not increase longevity in human beings and other species able to leave unsuitable environments. *Biogerontology* **7**, 149-152.
- Lee, C.K., Klopp, R.G., Weindruch, R., Prolla, T.A. (1999). Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285**, 1390-1393.
- Lee, C.K., Weindruch, R., Prolla, T.A. (2000). Gene expression profile of the ageing brain in mice.

Nature Genet 25, 294-7.

Lee, G.D., Wilson, M.A., Zhu, M., Wolkow, C.A., De Cabo, R., Ingram, D.K., Zou, S.G. (2006). Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Aging Cell 5, 515-524.

Lee, R.Y.N., Hensch, J., Ruvkun, G. (2001). Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the DAF-2 insulin-like signaling pathway. Current Biology 11, 1950-1957.

Lee, S.S., Kennedy, S., Tolonen, A.C., Ruvkun, G. (2003). DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. Science 300, 644-7.

Lee, S.S., Lee, R.Y.N., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Ruvkun, G. (2003). A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. Nature Genetics 33, 40-48.

Leevers, S.J., Weinkove, D., Macdougall, L.K., Hafen, E., Waterfield, M.D. (1996). The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase dp110 promotes cell growth. EMBO Journal 15, 6584-6594.

Lemieux, J., Lakowski, B., Webb, A., Meng, Y., Ubach, A., Bussiere, F., Barnes, T., Hekimi, S. (2001). Regulation of physiological rates in *Caenorhabditis elegans* by a tRNA-modifying enzyme in the mitochondria. Genetics 159, 147-57.

Leroi, A.M., Bartke, A., De Benedictis, G., Franceschi, C., Gartner, A., Gonos, E.S., Fedei, M.E., Kivisild, T., Lee, S., Kartaf-Ozer, N., Schumacher, M., Sikora, E., Slagboom, E., Tatar, M., Yashin, A.I., Vijg, J., Zwaan, B. (2005). What evidence is there for the existence of individual genes with antagonistic pleiotropic effects? Mechanisms of Ageing and Development 126, 421-429.

Lesnfsky, E.J., Hoppel, C.L. (2006). Oxidative phosphorylation and aging. Ageing Research Reviews 5, 402-433.

Levine, M. (1986). New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. New England Journal of Medicine 314, 892-902.

Levy, M.Z., Allsopp, R.C., Futcher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. Journal of Molecular Biology 225, 951-960.

Lewis, S.E., Goldspink, D.F., Phillips, J.G., Merry, B.J., Holehan, A.M. (1985). The effects of aging and chronic dietary restriction on whole body growth and protein turnover in the rat. Experimental Gerontology 20, 253-263.

Li, W., Gao, B., Lee, S.-M., Bennett, K., and Fang, D. (2007). RLE-1, an E3 ubiquitin ligase, regulates *C. elegans* aging by catalyzing DAF-16 polyubiquitination. Developmental Cell 12, 235-246.

Li, W., Kennedy, S.G., Ruvkun, G. (2003). *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. Genes & Development 17, 844-858.

Li, Y., Corradetti, M.N., Inoki, K., Guan, K.L. (2004). Tsc2: filling the gap in the mTOR signaling pathway. Trends in Biochemical Sciences 29, 32-38.

Liang, H.Y., Masoro, E.J., Nelson, J.F., Strong, R., McMahon, C.A., Richardson, A. (2003). Genetic mouse models of extended lifespan. Experimental Gerontology 38, 1353-1364.

- Liao, X., Butow, R.A. (1993). RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72, 61-71.
- Liao, X.S., Small, W.C., Srere, P.A., Butow, R.A. (1991). Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (Cit2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 11, 38-46.
- Libina, N., Berman, J.R., Kenyon, C. (2003). Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* 115, 489-502.
- Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., Kenyon, C. (1997). daf-16: a HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278, 1319-1322.
- Lin, K., Hsin, H., Libina, N., Kenyon, C. (2001). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nature Genetics* 28, 139-45.
- Lin, S.J., Defossez, P.A., Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-8.
- Lin, S.J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.A., Culotta, V.C., Fink, G.R., Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344-348.
- Lipman, R.D., Smith, D.E., Blumberg J.B., Bronson, R.T. (1998). Effects of caloric restriction or augmentation in adult rats: longevity and lesion biomarkers of aging. *Aging (Milano)* 10, 463-470.
- Lithgow, G.J. (2006). Why aging isn't regulated: a lamentation on the use of language in aging literature. *Experimental Gerontology* 41, 890-893.
- Lithgow, G.J., Walker, G.A. (2002). Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 765-771.
- Lithgow, G.J., White, T.M., Melov, S., Johnson, T.E. (1995). Thermotolerance and extended life span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7540-7544.
- Liu, X., Jiang, N., Hughes, B., Bigras, E., Shoubridge, E., Hekimi, S. (2005). Evolutionary conservation of the *clk-1*-dependent mechanism of longevity: loss of *mclk1* increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes & Development* 19, 2424-2434.
- Long, X.M., Spycher, C., Han, Z.S., Rose, A.M., Muller, F., Avruch, J. (2002). TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. *Current Biology* 12, 1448-1461.
- Longo, V.D. (1999). Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. *Neurobiology of Aging* 20, 479-86.
- Longo, V.D., Finch, C.E. (2003). Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* 299, 1342-1346.
- Lopez-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M.V., Allard, J., Ingram, D.K., Navas, P., De Cabo, R. (2006). Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and

bioenergetic efficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 1768-1773.

Lopez-Torres, M., Gredilla, R., Sanz, A., Barja, G. (2002). Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. Free Radical Biology and Medicine *32*, 882-889.

Lorin, S., Dufour, E., Sainsard-Chanet, A. (2006). Mitochondrial metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics *1757*, 604-610.

Ludewig, A.H., Kober-Eisermann, C., Weitzel, C., Bethke, A., Neubert, K., Gerisch, B., Hutter, H., Antebi, A. (2004). A novel nuclear receptor/coregulator complex controls *C. elegans* lipid metabolism, larval development, and aging. Genes & Development *18*, 2120-2133.

Lund, J., Tedesco, P., Duke, K., Wang, J., Kim, S.K., Johnson, T.E. (2002). Transcriptional profile of aging in *C. elegans*. Current Biology *12*, 1566-1573.

Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. Cell *107*, 137-148.

Maas M.F.P.M., De Boer, H.J., Debets, A.J.M., Hoekstra, R.F. (2004). The mitochondrial plasmid pAL2-1 reduces calorie restriction mediated life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*. Fungal Genetics and Biology *41*, 865-871.

Maas M.F.P.M., Hoekstra, R.F., Debets, A.J.M. (2007). A mitochondrial mutator plasmid that causes senescence under dietary restricted conditions. BMC Genetics *8*, 9.

Magwere, T., Chapman, T., Partridge, L. (2004). Sex differences in the effect of dietary restriction on life span and mortality rates in female and male *Drosophila melanogaster*. Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences *59*, 3-9.

Magwere, T., West, M., Riyahi, K., Murphy, M.P., Smith, R.A.J., Partridge, L. (2006). The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. Mechanisms of Ageing and Development *127*, 356-370.

Mair, W., Goymer, P., Pletcher, S.D., Partridge, L. (2003). Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. Science *301*, 1731-1733.

Mair, W., Piper, M.D.W., Partridge, L. (2005). Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. PloS Biology *3*, 1305-1311.

Mair, W., Sgro, C.M., Johnson, A.P., Chapman, T., Partridge, L. (2004). Lifespan extension by dietary restriction in female *Drosophila melanogaster* is not caused by a reduction in vitellogenesis or ovarian activity. Experimental Gerontology *39*, 1011-1019.

Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., Cantley, L.C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt Pathway. Molecular Cell *10*, 151-162.

Martin, D.E., Hall, M.N. (2005). The expanding TOR signaling network. Current Opinion in Cell Biology *17*, 158-166.

- Martin, G.M., Austad, S.N., Johnson, T.E. (1996). Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Genetics* *13*, 25-34.
- Martin, G.M., Oshima, J. (2000). Lessons from human progeroid syndromes. *Nature* *408*, 263-266.
- Martinez, D. E. (1998). Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Experimental Gerontology* *33*, 217-225.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry* *16*, 577-586.
- Masoro, E.J. (1992). Retardation of aging processes by food restriction - an experimental tool. *American Journal of Clinical Nutrition* *55*, S1250-S1252.
- Masoro, E.J. (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* *126*, 913-922.
- Masoro, E.J. (2006). Caloric restriction and aging: controversial issues. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* *61*, 14-19.
- Masoro, E.J. (2006). Dietary restriction-induced life extension: a broadly based biological phenomenon. *Biogerontology* *7*, 153-155.
- Masoro, E.J., Iwasaki, K., Gleiser, C.A., McMahan, C.A., Seo, E.J., Yu, B.P. (1989). Dietary modulation of the progression of nephropathy in aging rats - an evaluation of the importance of protein. *American Journal of Clinical Nutrition* *49*, 1217-1227.
- Masse, I., Molin, L., Billaud, M., Solari, F. (2005). Lifespan and dauer regulation by tissue-specific activities of *Caenorhabditis elegans daf-18*. *Developmental Biology* *286*, 91-101.
- Mathew, A., Pandey, M., Murthy, N.S. (1999). Survival analysis: caveats and pitfalls. *European Journal of Surgical Oncology* *25*, 321-329.
- Mattison, J.A., Lane, M.A., Roth, G.S., Ingram, D.K. (2003). Calorie restriction in rhesus monkeys. *Experimental Gerontology* *38*, 35-46.
- McCarter, R., Masoro, E.J., Yu, B.P. (1985). Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate? *American Journal of Physiology* *248*, E488-490.
- McCarter, R.J., Palmer, J. (1992). Energy metabolism and aging: a lifelong study of Fischer 344 rats. *American Journal of Physiology* *263*, E448-452.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A. (1935). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *Journal of Nutrition* *10*, 63-79.
- McClung, J.P., Roneker, C.A., Mu, W.P., Lisk, D.J., Langlais, P., Liu, F., Lei, X.G. (2004). Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 8852-8857.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* *244*, 6049-6055.

- McElwee, J., Bubbs, K., and Thomas, J. H. (2003). Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* 2, 111-121.
- McElwee, J.J., Schuster, E., Blanc, E., Thomas, J.H., Gems, D. (2004). Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *Journal of Biological Chemistry* 279, 44533-44543.
- McElwee, J.J., Schuster, E., Blanc, E., Thornton, J., Gems, D. (2006). Diapause-associated metabolic traits reiterated in long-lived *daf-2* mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 458-472.
- McKay, J.P., Raizen, D.M., Gottschalk, A., Schafer, W.R., Avery, L. (2004). *eat-2* and *eat-18* are required for nicotinic neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Genetics* 166, 161-169.
- McKeown, C., Praitis, V., Austin, J. (1998). *sma-1* encodes a beta(H)-spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis. *Development* 125, 2087-2098.
- McKeown, C.R., Beckerle, M.C. (2001). <http://wormlab.caltech.edu/meetings/IWM2001.pdf>.
- McKeown, C.R., Han, H.F., Beckerle, M.C. (2006). Molecular characterization of the *Caenorhabditis elegans* ALP/Enigma gene *alp-1*. *Developmental Dynamics* 235, 530-538.
- Medawar, P.B. (1952). *An unsolved problem of Biology*. H.K. Lewis & Co, London.
- Medvedev, Z.A. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 65, 375-398.
- Meissner, B., Boll, M., Daniel, H., Baumeister, R. (2004). Deletion of the intestinal peptide transporter affects insulin and TOR signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 36739-36745.
- Melendez, A., Tallozy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H., Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life span extension in *C. elegans*. *Science* 301, 1387-1391.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R., Lithgow, G.J. (2000). Extension of life span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289, 1567-9.
- Merry, B.J. (2002). Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 1340-1354.
- Merry, B.J. (2005). Dietary restriction in rodents - delayed or retarded ageing? *Mechanisms of Ageing and Development* 126, 951-959.
- Meyer, T.E., Kovacs, S.J., Ehsani, A.A., Klein, S., Holloszy, J.O., Fontana, L. (2006). Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 47, 398-402.
- Miller, R.A., Harper, J.M., Galecki, A., Burke, D.T. (2002). Big mice die young: early life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice. *Aging Cell* 1, 22-29.

- Min, K.J., Flatt, T., Kulaots, I., Tatar, M. (2007). Counting calories in *Drosophila* diet restriction. *Experimental Gerontology* **42**, 247-251.
- Min, K.J., Tatar, M. (2006). *Drosophila* diet restriction in practice: do flies consume fewer nutrients? *Mechanisms of Ageing and Development* **127**, 93-96.
- Miquel, J., Lundgren, P.R., Bensch, K.G., Atlan, H. (1976). Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development* **5**, 347-370.
- Miron, M., Verdu, J., Lachance, P.E., Birnbaum, M.J., Lasko, P.F., Sonenberg, N. (2001). The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nature Cell Biology* **3**, 596-601.
- Miwa, S., Riyahi, K., Partridge, L., and Brand, M. D. (2004). Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1019**, 388-391.
- Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L., Brand, M.D. (2003). Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* **35**, 938-948.
- Miyadera, H., Amino, H., Hiraishi, A., Taka, H., Murayama, K., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Ishii, N., Hekimi, S., Kita, K. (2001). Altered quinone biosynthesis in the long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7713-7716.
- Mondelaers, W., Van Laere, K., Goedefroot, A., Van den Bossche, K. (1996). The Gent University 15 MeV high-current linear electron accelerator facility. *Nuclear Instruments and Methods Section A* **368**, 278-282.
- Morck, C., Pilön, M. (2006). *C. elegans* feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. *BMC Developmental Biology* **6**.
- Morck, C., Pilön, M. (2007). Caloric restriction and autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* **3**.
- Mori, I., Ohshima, Y. (1995). Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **376**, 344-348.
- Morley, J.F., Morimoto, R.I. (2004). Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 657-664.
- Morris, J.Z., Tissenbaum, H.A., Ruvkun, G. (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **382**, 536-9.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **385**, 13-19.
- Mortimer, R.K., Johnston, J.R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature* **183**, 1751-1752.
- Motta, M.C., Divecha, N., Lemieux, M., Kamel, C., Chen, D., Gu, W., Bultsma, Y., Mcburney, M., Guarente, L. (2004). Mammalian Sirt1 represses forkhead transcription factors. *Cell* **116**, 551-563.
- Moynihan, K.A., Grimm, A.A., Plueger, M.M., Bernal-Mizrachi, E., Ford, E., Cras-Meneur, C., Permutt,

M.A., Imai, S.I. (2005). Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metabolism* 2, 105-117.

Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human-chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6622-6626.

Mukhopadhyay, A., Deplancke, B., Walhout, A.J.M., Tissenbaum, H.A. (2005). *C. elegans* Tubby regulates life span and fat storage by two independent mechanisms. *Cell Metabolism* 2, 35-42.

Muller, F.L., Liu, Y.H., Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry* 279, 49064-49073.

Munkres, K., Rana, R.S. (1978). Antioxidants prolong life span and inhibit the senescence-dependent accumulation of fluorescent pigment (lipofuscin) in clones, of *Podospora anserina*. *Mechanisms of Ageing and Development* 7, 407-415.

Munoz, M.J., Riddle, D.L. (2003). Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity. *Genetics* 163, 171-180.

Murakami, M., Koga, M., Ohshima, Y. (2001). *daf-7*/TGF-Beta expression required for the normal larval development in *C. elegans* is controlled by a presumed guanylyl cyclase *daf-11*. *Mechanisms of Development* 109, 27-35.

Murakami, S., Johnson, T.E. (1996). A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 143, 1207-1218.

Murakami, S., Johnson, T.E. (1998). Life extension and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* modulated by the *tkr-1* gene. *Current Biology* 8, 1091-1094.

Murakami, S., Johnson, T.E. (2001). The OLD-1 positive regulator of longevity and stress resistance is under DAF-16 regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 11, 1517-23.

Murphy, C.T. (2006). The search for Daf-16/Foxo transcriptional targets: approaches and discoveries. *Experimental Gerontology* 41, 910-921.

Murphy, C.T., Mccarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C. (2003). Genes that act downstream of *daf-16* to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277-284.

Muylaert, J., Vanfleteren, J.R. (1999). In: licentiaatsthesis: Rol van de ontwikkelingsduur in de totale levensduur en mortaliteitsdynamiek bij *Caenorhabditis elegans*.

Naar, E.M., Bartke, A., Majumdar, S.S., Buonomo, F.C., Yun, J.S., Wagner, T.E. (1991). Fertility of transgenic female mice expressing bovine growth hormone or human growth hormone variant genes. *Biology of Reproduction* 45, 178-187.

Nakae, J., Park, B.C., Accili, D. (1999). Insulin stimulates phosphorylation of the Forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through wortmannin-sensitive pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15982-15985.

- Nakai, D., Shimizu, T., Nojiri, H., Uchiyama, S., Koike, H., Takahashi, M., Hirokawa, K., Shirasawa, T. (2004). *coq7clk-1* regulates mitochondrial respiration and the generation of reactive oxygen species via coenzyme Q. *Aging Cell* **3**, 273-281.
- Nakai, D., Yuasa, S., Takahashi, M., Shimizu, T., Asaumi, S., Isono, K., Takao, T., Suzuki, Y., Kuroyanagi, H., Hirokawa, K., Koseki, H., Shirasawa, T. (2001). Mouse homologue of *coq7clk-1*, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochemistry and Biophysics Research Community* **289**, 463-471.
- Nakamura, A., Yasuda, K., Adachi, H., Sakurai, Y., Ishii, N., Goto, S. (1999). Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry and Biophysics Research Community* **264**, 580-583.
- Navarro, I., Leibush, B., Moon, T.W., Plisetskaya, E.M., Banos, N., Méndez, E., Planas, J.V., Gutiérrez, J. (1999). Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **122**, 137-153.
- Nehrke, K. (2003). A reduction in intestinal cell pH(i) due to loss of the *Caenorhabditis elegans* Na⁺/H⁺ exchanger Nhx-2 increases life span. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 44657-44666.
- Neufeld, T.P. (2003). Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development. *Mechanisms of Development* **120**, 1283-1296.
- Nikolich-Zugich, J., Messaoudi, I. (2005). Mice and flies and monkeys too: caloric restriction rejuvenates the aging immune system of non-human primates. *Experimental Gerontology* **40**, 884-893.
- Norman, K.R., Moerman, D.G. (2002). Alpha spectrin is essential for morphogenesis and body wall muscle formation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology* **157**, 665-677.
- Ogburn, C.E., Austad, S.N., Holmes, D.J., Kiklevich, J.V., Gollahon, K., Rabinovitch, P.S., Martin, G.M. (1998). Cultured renal epithelial cells from birds and mice: Enhanced resistance of avian cells to oxidative stress and DNA damage. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **53**, B287-B292.
- Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A., Ruvkun, G. (1997). The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389**, 994-9.
- Ogg, S., Ruvkun, G. (1998). The C-Elegans Pten Homolog, Daf-18, Acts in the Insulin Receptor-Like Metabolic Signaling Pathway. *Molecular Cell* **2**, 887-893.
- Oh, S.W., Mukhopadhyay, A., Dixit, B.L., Raha, T., Green, M.R., Tissenbaum, H.A. (2006). Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nature Genetics* **38**, 251-257.
- Oh, S.W., Mukhopadhyay, A., Svzrikapa, N., Jiang, F., Davis, R.J., Tissenbaum, H.A. (2005). JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of Forkhead transcription factor/DAF-16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4494-4499.

Oldham, S., Hafen, E. (2003). Insulin/IGF and Target of Rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends in Cell Biology* 13, 79-85.

Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology* 41, 181-190.

Orentreich, N., Matias, J.R., Defelice, A., Zimmerman, J.A. (1993). Low methionine ingestion by rats extends life span. *Journal of Nutrition* 123, 269-274.

Orr, W.C., Mockett, R.J., Benes, J.J., Sohal, R.S. (2003). Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 26418-26422.

Osiewacz, H.D. (2002). Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 755-764.

Osiewacz, H.D. (2002). Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Research Reviews* 1, 425-442.

Osiewacz, H.D., Esser, K. (1984). The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: a mobile intron of a mitochondrial gene. *Current Genetics* 8, 299-305.

Osiewacz, H.D., Nuber, U. (1996). GRISEA, a putative copper-activated transcription factor from *Podospora anserina* involved in differentiation and senescence. *Molecular and General Genetics* 252, 115-124.

Page, R.E., Peng, C.Y.S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology* 36, 695-711.

Pan, K.Z., Palter, J.E., Rogers, A.N., Olsen, A., Chen, D., Lithgow, G.J., Kapahi, P. (2007). Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 6, 111-119.

Panowski, S.H., Wolff, S., Aguilaniu, H., Durieux, J., Dillin, A. (2007). *Pha-4/Foxa* mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature* 447, 550-U2.

Paolisso, G., Gambardella, A., Ammendola, S., D'Amore, A., Balbi, V., Varricchio, M., D'Onofrio, F. (1996). Glucose tolerance and insulin action in healthy centenarians. *American Journal of Physiology* 270, E890-894.

Paradis, S., Ailion, M., Toker, A., Thomas, J.H., Ruvkun, G. (1999). A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development* 13, 1438-1452.

Paradis, S., Ruvkun, G. (1998). *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes & Development* 12, 2488-2498.

Parkes, T.L., Elia, A.J., Dickinson, D., Hilliker, A.J., Phillips, J.P., Boulianne, G.L. (1998). Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nature Genetics* 19, 171-174.

Partridge, L., Gems, D. (2002). Mechanisms of ageing: public or private? *Nature Reviews Genetics* 3, 165-75.

- Partridge, L., Gems, D. (2002). The evolution of longevity. *Current Biology* 12, R544-R546.
- Partridge, L., Gems, D., Withers, D.J. (2005). Sex and death: what is the connection? *Cell* 120, 461-472.
- Partridge, L., Pletcher, S.D., Mair, W. (2005). Dietary restriction, mortality trajectories, risk and damage. *Mechanisms of Ageing and Development* 126, 35-41.
- Pearl, R. (1928). *The rate of living*. Knopf, New York.
- Petriv, O.I., Rachubinski, R.A. (2004). Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 19996-20001.
- Phelan, J.P., Rose, M.R. (2005). Why dietary restriction substantially increases longevity in animal models but won't in humans. *Ageing Research Reviews* 4, 339-350.
- Phelan, J.P., Rose, M.R. (2006). Caloric restriction increases longevity substantially only when the reaction norm is steep. *Biogerontology* 7, 161-164.
- Picard, F., Kurtev, M., Chung, N.J., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., De Oliveira, R.M., Leid, M., Mcburney, M.W., Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-Gamma. *Nature* 429, 771-776.
- Pierce, S.B., Costa, M., Wisotzkey, R., Devadhar, S., Homburger, S.A., Buchman, A.R., Ferguson, K.C., Heller, J., Platt, D.M., Pasquinelli, A.A., Liu, L.X., Doberstein, S.K., Ruvkun, G. (2001). Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes & Development* 15, 672-686.
- Pinan-Lucarre, B., Iraqui, I., Clave, C. (2006). *Podospora anserina* target of rapamycin. *Current Genetics* 50, 23-31.
- Piper, M.D.W., Mair, W., Partridge, L. (2005). Counting the calories: the role of specific nutrients in extension of life span by food restriction. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 60, 549-555.
- Piper, M.D.W., Mair, W., Partridge, L. (2007). Dietary restriction in *Drosophila*: delayed aging or experimental artifact? *PLoS Genetics* 3, 461-466.
- Pletcher, S.D., Khazaeli, A.A., Curtsinger, J.W. (2000). Why do life spans differ? Partitioning mean longevity differences in terms of age-specific mortality parameters. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 55, B381-B389.
- Pletcher, S.D., Macdonald, S.J., Marguerie, R., Certa, U., Stearns, S.C., Goldstein, D.B., Partridge, L. (2002). Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* 12, 712-723.
- Potter, C.J., Pedraza, L.G., Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature Cell Biology* 4, 658-665.
- Powers, R.W., Kaeberlein, M., Caldwell, S.D., Kennedy, B.K., Fields, S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes & Development* 20, 174-184.
- Promislow, D.E.L., Tatar, M., Khazaeli, A.A., Curtsinger, J.W. (1996). Age-specific patterns of genetic

variance in *Drosophila melanogaster*. 1. Mortality. *Genetics* **143**, 839-848.

Pryor, W.A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annual Review of Physiology* **48**, 657-667.

Pugh, T.D., Klopp, R.G., Weindruch, R. (1999a). Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. *Neurobiology of Aging* **20**, 157-165.

Pugh, T.D., Oberley, T.D., Weindruch, R. (1999b). Dietary intervention at middle age: caloric restriction but not dehydroepiandrosterone sulfate increases lifespan and lifetime cancer incidence in mice. *Cancer Research* **59**, 1642-1648.

Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M.L., Tjian, R. (2003). Control of cell number by *Drosophila* Foxo: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & Development* **17**, 2006-2020.

Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 22028-22034.

Raha, S., Robinson, B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 502-508.

Raices, M., Maruyama, H., Dillin, A., Karlseder, J. (2005). Uncoupling of longevity and telomere length in *C. elegans*. *PloS Genetics* **1**, 295-301.

Raizen, D.M., Avery, L. (1994). Electrical activity and behavior in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* **12**, 483-495.

Raizen, D.M., Lee, R.Y., Avery, L. (1995). Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **141**, 1365-82.

Ramsey, J.J., Colman, R.J., Binkley, N.C., Christensen, J.D., Gresl, T.A., Kemnitz, J.W., Weindruch, R. (2000). Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study. *Experimental Gerontology* **35**, 1131-1149.

Rao, G., Xia, E.N., Nadakavukaren, M.J., Richardson, A. (1990). Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *Journal of Nutrition* **120**, 602-609.

Rattan, S.I.S. (2005). Anti-ageing strategies: prevention or therapy? Slowing ageing from within. *EMBO Reports* **6**, S25-S29.

Rea, S., Johnson, T.E. (2003). A metabolic model for life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell* **5**, 197-203.

Rea, S.L. (2005). Metabolism in the *Caenorhabditis elegans* Mit mutants. *Experimental Gerontology* **40**, 841-849.

Rea, S.L., Wu, D.Q., Cypser, J.R., Vaupel, J.W., Johnson, T.E. (2005). A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics* **37**, 894-898.

- Reiss, U., Rothstein, M. (1975). Age-related changes in isocitrate lyase from free living nematode, *Turbatrix aceti*. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 826-830.
- Ren, C., Webster, P., Finkel, S.E., Tower, J. (2007). Increased internal and external bacterial load during *Drosophila* aging without life-span trade-off. *Cell Metabolism* **6**, 144-152.
- Reznick, A.Z., Gershon, D. (1977). Age related alterations in purified fructose-1,6-diphosphate aldolase from the nematode *Turbatrix aceti*. *Mechanisms of Ageing and Development* **6**, 345-353.
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* **8**, 797-807.
- Ricklefs, R.E., Scheuerlein, A. (2002). Biological implications of the Weibull and Gompertz models of aging. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **57**, B69-B76.
- Riddle, D.L., Albert, P.S. (1997). In: Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess J.R. (eds.) *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess J.R. (1997). In: *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Riddle, D.L., Swanson, M.M., Albert, P.S. (1981). Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature* **290**, 668-71.
- Rizet, G. (1953). Sur la longévité des souches de *Podospora anserine*. *Comptes Rendus* **237**, 838-840.
- Roberts, R.B., Abelson, P.H., Cowie, D.B., Bolton, E.T., Britten, R.J. (1955). In: *Studies of biosynthesis in Escherichia coli* (Publication 607). Carnegie Institution of Washington.
- Rocha, J.S., Bonkowski, M.S., De Franca, L.R., Bartke, A. (2007). Effects of mild calorie restriction on reproduction, plasma parameters and hepatic gene expression in mice with altered GH/IGF-I Axis. *Mechanisms of Ageing and Development* **128**, 317-331.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of Pgc-1 Alpha and Sirt1. *Nature* **434**, 113-118.
- Rodwell, G.E.J., Sonu, R., Zahn, J.M., Lund, J., Wilhelmy, J., Wang, L.L., Xiao, W.Z., Mindrinos, M., Crane, E., Segal, E., Myers, B.D., Brooks, J.D., Davis, R.W., Higgins, J., Owen, A.B., Kim, S.K. (2004). A transcriptional profile of aging in the human kidney. *PloS Biology* **2**, 2191-2201.
- Rogina, B., Helfand, S.L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15998-16003.
- Rogina, B., Reenan, R.A., Nilsen, S.P., Helfand, S.L. (2000). Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science* **290**, 2137-40.
- Roth, G.S., Mattison, J.A., Ottinger, M.A., Chachich, M.E., Lane, M.A., Ingram, D.K. (2004). Aging in rhesus monkeys: relevance to human health interventions. *Science* **305**, 1423-1426.
- Rothstein, M. (1980). Nematodes as nutritional models, in: Zuckerman, B.M. (ed.), *Aging and other model systems*. Academic Press, New York.

Rottiers, V., Antebi, A. (2006). Control of *Caenorhabditis elegans* life history by nuclear receptor signal transduction. *Experimental Gerontology* **41**, 904-909.

Rottiers, V., Motola, D.L., Gerisch, B., Cummins, C.L., Nishiwaki, K., Mangelsdorf, D.J., Antebi, A. (2006). Hormonal control of *C. elegans* dauer formation and life span by a Rieske-like oxygenase. *Developmental Cell* **10**, 473-482.

Rudolph, K.L., Chang, S., Lee, H.W., Blasco, M., Gottlieb, G.J., Greider, C., DePinho, R.A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* **96**, 701-12.

Ruvkun, G., Hobert, O. (1998). The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **282**, 2033-41.

Salvioli, S., Olivieri, F., Marchegiani, F., Cardelli, M., Santoro, A., Bellavista, E., Mishto, M., Invidia, L., Capri, M., Valensin, S., Sevini, F., Cevenini, E., Celani, L., Lescai, F., Gonos, E., Caruso, C., Paolisso, G., De Benedictis, G., Monti, D., Franceschi, C. (2006). Genes, ageing and longevity in humans: problems, advantages and perspectives. *Free Radical Research* **40**, 1303-1323.

Savage-Dunn, C. (2001). Targets of TGF beta-related signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **12**, 305-312.

Sayre, F. W., Hansen, E. L., and Yarwood, E. A. Biochemical aspects of the nutrition of *Caenorhabditis briggsae*. *Experimental parasitology* **13**, 98-107. 1963.

Schackwitz, W.S., Inoue, T., Thomas, J.H. (1996). Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*. *Neuron* **17**, 719-728.

Schmidt, M., De Mattos, S.F., Van Der Horst, A., Klompmaker, R., Kops Gjpl, Lam, E.W.F., Burgering, B.M.T., Medema, R.H. (2002). Cell cycle inhibition by Foxo Forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 7842-7852.

Schrader, M., Fahimi, H.D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology* **122**, 383-393.

Schriner, S.E., Ogburn, C.E., Smith, A.C., Newcomb, T.G., Ladiges, W.C., Dolle, M.E.T., Vijg, J., Fukuchi, K.I., Martin, G.M. (2000). Levels of DNA damage are unaltered in mice overexpressing human catalase in nuclei. *Free Radical Biology and Medicine* **29**, 664-673.

Schulte, E., Kück, U., Esser, K. (1988). Extrachromosomal mutants from *Podospora anserine*: permanent vegetative growth in spite of multiple recombination events in the mitochondrial genome. *Molecular and General Genetics* **211**, 342-349.

Scott, R.C., Schuldiner, O., Neufeld, T.P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental Cell* **7**, 167-178.

Sedensky, M.M., Morgan, P.G. (2006). Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants. *Experimental Gerontology* **41**, 237-245.

Sekito, T., Thornton, J., Butow, R.A. (2000). Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2103-2115.

- Sellem, C.H., Marsy, S., Bolvin, A., Lemaire, C., Sainsard-Chanet, A. (2007). A mutation in the gene encoding cytochrome c1 leads to a decreased ROS content and to a long-lived phenotype in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 648-658.
- Senoo-Matsuda, N., Yasuda, K., Tsuda, M., Ohkubo, T., Yoshimura, S., Nakazawa, H., Hartman, P.S., Ishii, N. (2001). A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 41553-41558.
- Seo, A.Y., Hofer, T., Sung, B., Judge, S., Chung, H.Y., Leeuwenburgh, C. (2006). Hepatic oxidative stress during aging: effects of 8% long-term calorie restriction and lifelong exercise. *Antioxidants and Redox Signaling* **8**, 529-538.
- Shah, O.J., Wang, Z.Y., Hunter, T. (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Current Biology* **14**, 1650-1656.
- Shanley, D.P., Kirkwood, T.B.L. (2000). Calorie restriction and aging: a life-history analysis. *Evolution* **54**, 740-750.
- Sharma, H.K., Gupta, S.K., Rothstein, M. (1976). Age-related alteration of enolase in free-living nematode, *Turbatrix aceti*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **174**, 324-332.
- Shay, J.W., Wright, W.E. (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**, 867-874.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., Ames, B.N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10771-10778.
- Shimizu, K., Muranaka, Y., Fujimura, R., Ishida, H., Tazume, S., Shimamura, T. (1998). Normalization of reproductive function in germfree mice following bacterial contamination. *Experimental Animals* **47**, 151-158.
- Sho, H. (2001). History and characteristics of Okinawan longevity food. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **10**, 159-164.
- Sies, H. (1991). *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Academic Press, New York.
- Sies, H. (1997). *Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants*. *Experimental Physiology* **82**, 291-295.
- Simon, A.F., Shih, C., Mack, A., Benzer, S. (2003). Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Science* **299**, 1407-1410.
- Sinclair, D.A. (2005). Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mechanisms of Ageing and Development* **126**, 987-1002.
- Sinclair, D.A., Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell* **91**, 1033-42.
- Singh, V., Aballay, A. (2006). Heat shock and genetic activation of *hsf-1* enhance immunity to bacteria. *Cell Cycle* **5**, 2443-2446.

Skulachev, V.P. (1996). Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quarterly Reviews of Biophysics* 29, 169-202.

Smith, E.D., Kennedy, B.K., Kaeberlein, M. (2007). Genome-wide identification of conserved longevity genes in yeast and worms. *Mechanisms of Ageing and Development* 128, 106-111.

Snyder, D.L., Pollard, M., Wostmann, B.S., Luckert, P. (1990). Life span, morphology, and pathology of diet-restricted germ-free and conventional Lobund-Wistar rats. *Journals of Gerontology* 45, B52-58.

Soberman, R.J. (2003). The expanding network of redox signaling: new observations, complexities, and perspectives. *Journal of Clinical Investigation* 111, 571-574.

Sohal, R.S. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 37-44.

Sohal, R.S., Agarwal, S., Dubey, A., Orr, W.C. (1993). Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7255-7259.

Sohal, R.S., Sohal, B.H., Orr, W.C. (1995). Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Radical Biology and Medicine* 19, 499-504.

Sohal, R.S., Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59-63.

Solari, F., Bourbon-Piffaut, A., Masse, I., Payrastre, B., Chan, A.M.L., Billaud, M. (2005). The human tumour suppressor Pten regulates longevity and dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Oncogene* 24, 20-27.

Speakman, J.R., Talbot, D.A., Selman, C., Snart, S., McLaren, J.S., Redman, P., Krol, E., Jackson, D.M., Johnson, M.S., Brand, M.D. (2004). Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3, 87-95.

Spitz, D.R., Oberley, L.W. (1989). An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Analytical Biochemistry* 179, 8-18.

Sreekumar, R., Unnikrishnan, J., Fu, A., Nygren, J., Short, K.R., Schimke, J., Barazzoni, R., Nair, K.S. (2002). Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 283, E38-E43.

Stadtman, E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-4.

Stadtman, E.R., Oliver, C.N. (1991). Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *Journal of Biological Chemistry* 266, 2005-2008.

Stahl, U., Lemke, P.A., Tudzynski, P., Kück, U., Esser, K. (1978). Evidence for plasmid-like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics* 162, 341-343.

Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N. (1989). Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 275, 559-567.

- Starkov, A.A., Fiskum, G. (2003). Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *Journal of Neurochemistry* **86**, 1101-1107.
- Stenmark, P., Grunler, J., Mattsson, J., Sindelar, P.J., Nordlund, P., Berthold, D.A. (2001). A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. *coq7 (clk- 1)*, a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 33297-300.
- Stewart, E.J., Madden, R., Paul, G., Taddei, F. (2005). Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PloS Biology* **3**, 295-300.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 44784-44790.
- Sulston, J., Hodgkin, J.A. (1997). In: Wood, W.B. (ed.). *The nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sun, J., Tower, J. (1999). FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 216-28.
- Sun, J.T., Folk, D., Bradley, T.J., Tower, J. (2002). Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life Span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **161**, 661-672.
- Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-I defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73-77.
- Suzuki, N., Inokuma, K., Yasuda, K., and Ishii, N. Cloning, sequencing and mapping of a manganese superoxide dismutase gene of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *DNA Research* **3**, 171-174. 1996.
- Swanson, M.M., Riddle D.L. (1981). Critical periods in the development of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva. *Developmental Biology* **84**, 27-40.
- Syntichaki, P., Tavernarakis, N. (2006). Signaling pathways regulating protein synthesis during ageing. *Experimental Gerontology* **41**, 1020-1025.
- Syntichaki, P., Troulinaki, K., Tavernarakis, N. (2007). eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **445**, 922-926.
- Sze, J.Y., Victor, M., Loer, C., Shi, Y., Ruvkun, G. (2000). Food and metabolic signaling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* **403**, 560-564.
- Tanaka, T., Nakamura, H., Nishiyama, A., Hosoi, F., Masutani, H., Wada, H., Yodoi, J. (2000). Redox regulation by thioredoxin superfamily; protection against oxidative stress and aging. *Free Radical Research* **33**, 851-855.
- Tatar, M., Bartke, A., Antebi, A. (2003). The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299**, 1346-51.
- Tatar, M., Khazaeli, A.A., Curtsinger, J.W. (1997). Chaperoning extended life. *Nature* **390**, 30.

- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., Garofalo, R.S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292**, 107-110.
- Tatar, M., Yin, C. (2001). Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Experimental Gerontology* **36**, 723-738.
- Taub, J., Lau, J.F., Ma, C., Hahn, J.H., Hoque, R., Rothblatt, J., Chalfie, M. (1999). A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* *daf-c* and *clk-1* mutants. *Nature* **399**, 162-166.
- Tazume, S., Umehara, K., Matsuzawa, H., Aikawa, H., Hashimoto, K., Sasaki, S. (1991). Effects of germfree status and food restriction on longevity and growth of mice. *Jikken Dobutsu* **40**, 517-522.
- Tee, A.R., Fingar, D.C., Manning, B.D., Kwiatkowski, D.J., Cantley, L.C., Blenis, J. (2002). Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13571-13576.
- Terman, A., Abrahamsson, N., Brunk, U.T. (1999a). Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show increased susceptibility to oxidative stress. *Experimental Gerontology* **34**, 755-770.
- Terman, A., Brunk, U.T. (2004). Lipofuscin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 1400-1404.
- Terman, A., Dalen, H., Brunk, U.T. (1999b). Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show decreased survival time and diminished autophagocytosis during amino acid starvation. *Experimental Gerontology* **34**, 943-957.
- Thevelein, J. M. and de Winder J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **33**, 904-918.
- Thomas, D.D., Liu, Z.P., Kantrow, S.P., Lancaster, J.R. (2001). The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O². *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 355-360.
- Thomas, J.H., Birnby, D.A., Vowels, J.J. (1993). Evidence for parallel processing of sensory information controlling dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **134**, 1105-1117.
- Thompson, L.V. (2006). Oxidative stress, mitochondria and mtDNA-mutator mice. *Experimental Gerontology* **41**, 1220-1222.
- Timiras, P.S. (1994). *Physiological basis of aging and geriatrics*, second edition. CRC Press.
- Timmons, L., Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
- Tissenbaum, H.A., Guarente, L. (2001). Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227-230.
- Tissenbaum, H.A., Hawdon, J., Perregaux, M., Hotez, P., Guarente, L., Ruvkun, G. (2000). A common muscarinic pathway for diapause recovery in the distantly related nematode species *Caenorhabditis elegans* and *Ancylostoma caninum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 460-465.

- Toivonen, J.M., Walker, G.A., Martinez-Diaz, P., Bjedov, I., Driege, Y., Jacobs, H.T., Gems, D., Partridge, L. (2007). No influence of *Indy* on lifespan in *Drosophila* after correction for genetic and cytoplasmic background effects. *PLoS Genetics* **3**, 973-983.
- Tremblay, F., Marette, A. (2001). Amino acid and insulin signaling via the mTOR/P70 S6 Kinase pathway - a negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 38052-38060.
- Trifunovic, A., Hansson, A., Wredenberg, A., Rovio, A.T., Dufour, E., Khvorostov, I., Spelbrink, J.N., Wibom, R., Jacobs, H.T., Larsson, N.G. (2005). Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 17993-17998.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H.T., Larsson, N.G. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA Polymerase. *Nature* **429**, 417-423.
- Trumpower, B.L. (1990). The protonmotive Q-cycle - Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome-bc1 Complex. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 11409-11412.
- Tsang, W.Y., Lemire, B.D. (2002). Mitochondrial genome content is regulated during nematode development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **291**, 8-16.
- Tsang, W.Y., Lemire, B.D. (2003). The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1638**, 91-105.
- Tsuchiya, T., Dhahbi, J.M., Cui, X.P., Mote, P.L., Bartke, A., Spindler, S.R. (2004). Additive regulation of hepatic gene expression by dwarfism and caloric restriction. *Physiological Genomics* **17**, 307-315.
- Tu, M.P., Tatar, M. (2003). Juvenile diet restriction and the aging and reproduction of adult *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **2**, 327-333.
- Van Der Horst, A., Tertoolen, L.G.J., De Vries-Smits, L.M.M., Frye, R.A., Medema, R.H., Burgering, B.M.T. (2004). Foxo4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hsr2(Sirt1). *Journal of Biological Chemistry* **279**, 28873-28879.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., Alderson, N.L., Baynes, J.W., Epstein, C.J., Huang, T.T., Nelson, J., Strong, R., Richardson, A. (2003). Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiological Genomics* **16**, 29-37.
- Van Voorhies, W.A. (2002). Metabolism and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 587-596.
- Van Voorhies, W.A., Ward, S. (1999). Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11399-403.
- Vanfleteren, J.R. (1974). Nematode growth factor. *Nature* **248**, 255-257.

Vanfleteren, J.R. (1978). Axenic culture of free-living, plant-parasitic, and insect-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* **16**, 131-157.

Vanfleteren, J.R. (1980). Nematodes as nutritional models, in: Zuckerman, B.M. (ed.), *Aging and other model systems*. Academic Press, New York.

Vanfleteren, J.R. (1993). Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal* **292**, 605-608.

Vanfleteren, J.R., Braeckman, B.P. (1999). Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Aging* **20**, 487-502.

Vanfleteren, J.R., Braeckman, B.P., Roelens, I., De Vreese, A. (1998). Age-specific modulation of light production potential, and alkaline phosphatase and protein tyrosine kinase activities in various age mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **53**, B380-390.

Vanfleteren, J.R., De Vreese, A. (1994). Analysis of the proteins of aging *Caenorhabditis elegans* by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **15**, 289-96.

Vanfleteren, J.R., De Vreese, A. (1995). The gerontogenes *age-1* and *daf-2* determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal* **9**, 1355-1361.

Vanfleteren, J.R., De Vreese, A. (1996). Rate of aerobic metabolism and superoxide production rate potential in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology* **274**, 93-100.

Vanfleteren, J.R., De Vreese, A., Braeckman, B.P. (1998). Two-parameter logistic and Weibull equations provide better fits to survival data from isogenic populations of *Caenorhabditis elegans* in axenic culture than does the Gompertz model. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **53**, B393-403; discussion B404-8.

Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L. (1997). Alternative oxidase: from gene to function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 703-734.

Vaupel, J.W., Carey, J.R., Christensen, K., Johnson, T.E., Yashin, A.I., Holm, N.V., Iachine, I.A., Kannisto, V., Khazaeli, A.A., Liedo, P., Longo, V.D., Zeng, Y., Manton, K.G., Curtsinger, J.W. (1998). Biodemographic trajectories of longevity. *Science* **280**, 855-60.

Vaziri, H., Dessain, S.K., Eagon, E.N., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., Weinberg, R.A. (2001). hSir2(Sirt1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149-159.

Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L., Muller, F. (2003). Genetics - influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426**, 620.

Ventura, N., Rea, S.L., Testi, R. (2006). Long-lived *C. elegans* mitochondrial mutants as a model for human mitochondrial-associated diseases. *Experimental Gerontology* **41**, 974-991.

Verdu, J., Buratovich, M.A., Wilder E.L., Birnbaum, M.J. (1999). Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nature Cell Biology* **1**, 500-506.

Vergara, M., Smith-Wheelock, M., Harper, J.M., Sigler, R., Miller, R.A. (2004). Hormone-treated Snell dwarf mice regain fertility but remain long-lived and disease resistant. *Journals of Gerontology Series*

A: Biological Sciences and Medical Sciences *59*, 1244-1250.

Viswanathan, M., Kim, S.K., Berdichevsky, A., Guarente, L. (2005). A role for *sir-2.1* regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Developmental Cell* *9*, 605-615.

Voet, D., Voet, J. (1995). *Biochemistry*, second edition. John Wiley and Sons, Inc.

Vowels, J.J., Thomas, J.H. (1992). Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *130*, 105-123.

Walford, R.L., Harris, S.B., Gunion, M.W. (1992). The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere-2 significantly lowers blood-glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 11533-11537.

Walford, R.L., Mock, D., Verdery, R., Maccallum, T. (2002). Calorie restriction in Biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* *57*, B211-B224.

Walker, D.W., Hajek, P., Muffat, J., Knoepfle, D., Cornelison, S., Attardi, G., Benzer, S. (2006). Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 16382-16387.

Walker, D.W., McColl, G., Jenkins, N.L., Harris, J., Lithgow, G.J. (2000). Evolution of lifespan in *C. elegans*. *Nature* *405*, 296-7.

Walker, G. A. and Lithgow, G. J. (2003). Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell* *2*, 131-139.

Walker, G., Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R., Gems, D. (2005). Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mechanisms of Ageing and Development* *126*, 929-937.

Walker, G.A., White, T.M., McColl, G., Jenkins, N.L., Babich, S., Candido, E.P., Johnson, T.E., Lithgow, G.J. (2001). Heat shock protein accumulation is upregulated in a long-lived mutant of *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* *56*, B281-287.

Wang, Y., Oh, S.W., Deplancke, B., Luo, J., Walhout, A.J.M., Tissenbaum, H.A. (2006). *C. elegans* 14-3-3 proteins regulate life span and interact with *sir-2.1* and *daf-16*/Foxo. *Mechanisms of Ageing and Development* *127*, 741-747.

Wang, Y., Tissenbaum, H.A. (2006). Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mechanisms of Ageing and Development* *127*, 48-56.

Weindruch, R. (1996). Caloric restriction and aging. *Scientific American* *274*, 46-52.

Weindruch, R. (2006). Will dietary restriction work in primates? *Biogerontology* *7*, 169-171.

Weindruch, R., Kayo, T., Lee, C.K., Prolla, T.A. (2001). Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *Journal of Nutrition* *131*, 918S-923S.

Weindruch, R., Walford, R.L. (1982). Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age - Effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* *215*, 1415-1418.

Weindruch, R., Walford, R.L., Fligiel, S., Guthrie, D. (1986). The retardation of aging in mice by dietary restriction - longevity, cancer, immunity and lifetime energy-intake. *Journal of Nutrition* *116*, 641-654.

Weinkove, D., Halstead, J.R., Gems, D., Divecha, N. (2006). Long-term starvation and ageing induce *age-1/PI 3-Kinase*-dependent translocation of DAF-16/Foxo to the Cytoplasm. *BMC Biology* *4*.

Weinkove, D., Leivers, S.J. (2000). The genetic control of organ growth: insights from *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics and Development* *10*, 75-80.

Welle, S., Brooks, A.I., Delehanty, J.M., Needler, N., Bhatt, K., Shah, B., Thornton, C.A. (2004). Skeletal muscle gene expression profiles in 20-29 year old and 65-71 year old women. *Experimental Gerontology* *39*, 369-377.

Welle, S., Brooks, A.I., Delehanty, J.M., Needler, N., Thornton, C.A. (2003). Gene expression profile of aging in human muscle. *Physiological Genomics* *14*, 149-159.

Wick, G. (2002). 'Anti-aging' medicine: does it exist? A critical discussion of 'anti-aging health products'. *Experimental Gerontology* *37*, 1137-1140.

Willcox, D.C., Willcox, B.J., Todoriki, H., Curb, J.D., Suzuki, M. (2006). Caloric restriction and human longevity: What can we learn from the Okinawans? *Biogerontology* *7*, 173-177.

Williams, A.J., Cole, P.J. (1981). Investigation of alveolar macrophage function using lucigenin-dependent chemiluminescence. *Thorax* *36*, 866-869.

Williams, G.C. (1957). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* *11*, 398-411.

Wilson, D.L. (1993). A comparison of methods for estimating mortality parameters from survival data. *Mechanisms of Ageing and Development* *66*, 269-281.

Wilson, D.L. (1994). The analysis of survival (mortality) data: fitting Gompertz, Weibull, and logistic functions. *Mechanisms of Ageing and Development* *74*, 15-33.

Wohlgemuth, S.E., Julian, D., Akin, D.E., Fried, J., Toscano, K., Leeuwenburgh, C., Dunn, W.A. Jr. (2007). Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction. *Rejuvenation Research* *10*, 281-292.

Wolf, E., Kahnt, E., Ehrlein, J., Hermanns, W., Brem, G., Wanke, R. (1993). Effects of long-term elevation of serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models. *Mechanisms of Ageing and Development* *68*, 71-87.

Wolff, S., Ma, H., Burch, D., Maciel, G.A., Hunter, T., Dillin, A. (2006). SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity. *Cell* *124*, 1039-1053.

Wolkow, C.A., Kimura, K.D., Lee, M.S., Ruvkun, G. (2000). Regulation of *C. elegans* life span by insulin-like signaling in the nervous system. *Science* *290*, 147-50.

- Wolkow, C.A., Munoz, M.J., Riddle, D.L., Ruvkun, G. (2002). Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans daf-2* insulin-like signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277, 49591-49597.
- Wong, A., Boutis, P., Hekimi, S. (1995). Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 139, 1247-59.
- Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., Sinclair, D. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686-689.
- Wood, W.B. (1988). The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, J.R., Poole, L.B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 32-40.
- Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W., Shay, J.W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics* 18, 173-179.
- Wu, D.Q., Rea, S.L., Yashin, A.I., Johnson, T.E. (2006). Visualizing hidden heterogeneity in isogenic populations of *C. elegans*. *Experimental Gerontology* 41, 261-270.
- Wulschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Yan, L.J., Levine, R.L., Sohal, R.S. (1997). Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11168-11172.
- Yanase, S., Yasuda, K., Ishii, N. (2002). Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (*age-1*, *mev-1* and *daf-16*) that affect life span. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 1579-1587.
- Yarian, C.S., Torosier, D., Sohal, R.S. (2006). Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 79-84.
- Yasuda, K., Ishii, T., Suda, H., Akatsuka, A., Hartman, P.S., Goto, S., Miyazawa, M., Ishii, N. (2006). Age-related changes of mitochondrial structure and function in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 763-770.
- Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., Mayo, M.W. (2004). Modulation of NF-Kappa B-dependent transcription and cell survival by the Sirt1 deacetylase. *EMBO Journal* 23, 2369-2380.
- Yin, D. (1996). Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radical Biology and Medicine* 21, 871-888.
- Yokoyama, K., Fukumoto, K., Murakami, T., Harada, S., Hosono, R., Wadhwa, R., Mitsui, Y., Ohkuma, S. (2002). Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of *hsp70*, a homolog of *mot-2* (mortalin)/*mthsp70*/Grp75. *FEBS Letters* 516, 53-57.
- Yu, B.P. (2006). Why calorie restriction would work for human longevity. *Biogerontology* 7, 179-182.

Yu, B.P., Masoro, E.J., McMahan, C.A. (1985). Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *Journals of Gerontology* *40*, 657-670.

Yu, H., Larsen, P.L. (2001). DAF-16-dependent and independent expression targets of DAF-2 insulin receptor-like pathway in *Caenorhabditis elegans* include FKBP. *Journal of Molecular Biology* *314*, 1017-1028.

Zahavi, M., Tahori, A.S. (1965). Citric acid accumulation with age in houseflies and other Diptera. *Journal of Insect Physiology* *11*, 811-816.

Zhang, H. (2007). Molecular signaling and genetic pathways of senescence. *Journal of Cellular Physiology* *210*, 567-574.

Zhang, H.B., Stallock, J.P., Ng, J.C., Reinhard, C., Neufeld, T.P. (2000). Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes & Development* *14*, 2712-2724.

Zhang, Z.L., Huang, L.S., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., Kim, S.H. (1998). Electron transfer by domain movement in Stockbroker Bc(1). *Nature* *392*, 677-684.

Zimmerman, J.A., Malloy, V., Krajcik, R., Orentreich, N. (2003). Nutritional control of aging. *Experimental Gerontology* *38*, 47-52.